

5
2ej
Universidad Nacional Autónoma de México.

Colegio de Ciencias y Humanidades.

Unidad Académica de Ciclos Profesionales y Posgrado.

Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Organificación de Yodo por *Periplaneta americana*.

**Purificación y caracterización parcial de moléculas libres
radioyodadas**

TESIS

que para obtener el título de

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

presenta: Héctor Ongay Delhumeau.

México, D.F.

Octubre, 1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

■ GLOSARIO	5
■ INTRODUCCION	7
A Efecto de Tironinas y Extractos Tiroideos en Invertebrados	7
1 Estudios en Protozoarios	
2 Estudios en Metazoarios	
Celenterados	
Equinodermos, Crustáceos y Moluscos	
Artrópodos (Insectos)	
B Metabolismo de Yodo en Invertebrados	16
1 Estudios en Celenterados	
2 Estudios en Invertebrados Acuáticos	
3 Metabolismo de yodo en insectos	
■ RECAPITULACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
■ OBJETIVO Y ESTRATEGIA	20
A Objetivo	20
B Estrategia	20
■ MATERIALES Y METODOS	21
A Materiales	21
1 Animales	
2 Material radioactivo	
3 Patrones yodados	
4 Solventes	
5 Reactivos	
6 Equipo	
7 Soluciones	
B Procedimientos Experimentales	23
1 Administración del isótopo	
2 Colección de hemolinfa	
3 Disección	
4 Maceración	
5 Homogeneización	
6 Preparación de la hemolinfa	
C Métodos Analíticos	25

Cromatografía en placa fina	
Cromatografía descendente en papel	
D Análisis Estadísticos 26
■ RESULTADOS 27
A Optimización de la Técnica de Extracción/Purificación 27
1 Deslipidización	
2 Extracción de la fase acuosa	
Eficiencia de la extracción/purificación	
3 Protocolo final	
B Resultados Experimentales 36
1 Distribución endógena de yodo	
2 Organificación de yodo	
Caracterización parcial de moléculas organificadas	
a) Placa fina	
b) Cromatografía en papel	
■ DISCUSION 47
Optimización y Validación de la Metodología	
Distribución Endógena de Yodo	
Caracterización Parcial de Moléculas Organificadas	
Comentarios Finales y Perspectivas	
■ BIBLIOGRAFIA 52
■ APENDICE A 55

GLOSARIO

■ Términos

Ecllosionar. Apertura de huevos o crisálidas en insectos.

Estrobilación. Metamorfosis de celenterados de pólipo a medusa.

Extracto tiroideo. Glándulas tiroides enteras, deshidratadas y pulverizadas; en idioma inglés se conoce como "Thyroid powder".

Hemolinfa. Fluido biológico circulante de algunos invertebrados, análogo a la sangre.

Imago. Forma adulta de algunos insectos.

Larva. Forma motil e inmadura de algunos insectos.

Moléculas libres. Son aquellas que no están acopladas covalentemente a ninguna estructura sólida. No confundir con el término "libre" utilizado comúnmente para describir las hormonas no acopladas a proteínas plasmáticas.

Pólipo. Forma juvenil e inmadura de celenterados.

Pupa. Forma no motil de algunos insectos. Estadio intermedio entre larva e imago.

Puparia. Estructura sólida que protege a la pupa.

Pronasa. Extracto de enzimas hidrolíticas.

Tiroxín. Extracto hidrolizado y cristalizado de tiroides el cual tiene una mayor cantidad de T₄ que el extracto tiroideo.

■ ABREVIATURAS

a e	Actividad específica
PBS	Amortiguador de fosfatos en solución salina
sol 1	Amortiguador de CaCl ₂ 0.5%, glicina-NaOH 0.2 M, pH 9.6.
Bq	Béquerels
c/u	Cada uno
cpm	Cuentas por minuto
CV	Coefficiente de variación
°C	Grados Centígrados
DE	Desviación Estándar
Des Pc 1	Desconocido placa 1
Des Pc 2	Desconocido placa 2
Des Pp 1	Desconocido papel 1
Des Pp 2	Desconocido papel 2
DIH	Diyodohistidina
DIT	Diyodotirosina
EE	Error Estándar
EA	Extracto acuoso deslipidizado

xg	Veces la Gravedad
h	hora
ITF	Interfase
l	Litros
MIH	Monoyodohistidina
mg	Miligramos
ml	Mililitros
µg	Microgramos
µl	Microlitros
min	Minutos
MIT	Monoyodotirosina
p/v	Proporción peso a volumen
v/v	Proporción volumen a volumen
rT₃	3',5',3-triyodotironina o T ₃ reversa
TP	Tejido parenquimatoso, órganos blandos
T₂	3,5-diyodotironina
T₃	3',3,5-triyodotironina
T₄	3',5',3,5-tetrayodotironina o tiroxina
vgr	<i>Verbigracia</i>
vs	<i>Versus</i>

INTRODUCCION

Se sabe que la glándula tiroidea de los vertebrados acumula yodo y lo organifica en residuos de tirosina, formando 3-monoyodotirosina (MIT) y 3,5-diyodotirosina (DIT), los cuales posteriormente se acoplan para formar yodotironinas (para revisión véase: Taurog, 1979; Valverde-R y col, 1990). Así, al unirse dos moléculas de DIT se forma 3',5',3,5-tetrayodotironina o tiroxina (T₄) y en el caso de que se acople una molécula de MIT con otra de DIT se forma 3',3',5-triyodotironina (T₃). Al liberarse estas moléculas al sistema circulatorio ejercen un papel fisiológico como mensajeros químicos que está bien caracterizado en el caso de los vertebrados (para revisión véase: DeGroot, 1979; Oppenheimer y col, 1987).

La presente tesis tiene como objetivo el análisis de la posible presencia de moléculas yodadas en invertebrados, que a su vez podrían fungir como mensajeros químicos en estos organismos. Así, y con el propósito de ubicar este trabajo en su contexto biológico más amplio, en la primera sección se revisa la información disponible acerca de los efectos biológicos de las yodotironinas en invertebrados. Posteriormente, se presenta en forma resumida la información pertinente al metabolismo del yodo en estos organismos. En una tercera sección se recapitulan brevemente las dos secciones anteriores, para plantear así la hipótesis general de trabajo y la estrategia experimental. En seguida se presentan la metodología y los resultados experimentales obtenidos. Finalmente, estos resultados se comparan y discuten con respecto a la información existente, estableciendo así conclusiones razonablemente válidas.

A- EFECTOS DE TIRONINAS Y EXTRACTOS TIROIDEOS EN INVERTEBRADOS

Las primeras evidencias documentadas de que las hormonas tiroideas de vertebrados pueden ser bioactivas en invertebrados datan de 1908 (Alpatov, 1929). En ese año se informa que la adición de extracto tiroideo al medio de cultivo acelera el crecimiento celular de *Paramecium* (Nowikoff, 1908; cfr Goldsmith, 1949). A partir de entonces y durante las siguientes dos décadas, diversos investigadores se dedicaron a estudiar los posibles efectos biológicos de las tironinas y otros compuestos yodados en diferentes invertebrados, de tal forma que hacia el fin de la primera mitad de este siglo existía ya una abundante literatura al respecto (para revisión véase: Goldsmith, 1949). Sin embargo, es importante destacar que por sus deficiencias y errores metodológicos la mayor parte de estos trabajos brindan información poco confiable. Entre estos problemas, los más importantes se refieren a la dificultad para dosificar las cantidades del principio activo presente en los extractos, así como a la falta de controles positivos respecto al contenido proteínico del extracto. Lo anterior resulta aun ms relevante si se toma en cuenta que a partir de la segunda mitad de este siglo, se reduce significativamente el interés por estudiar este aspecto particular de la endocrinología comparada.

En esta forma el conocimiento acerca de los probables efectos biológicos de las tironinas y otros compuestos yodados se encuentra limitado y casi olvidado. Cabe mencionar que por esta misma razón muchos de los artículos originales de esa época (1908-1940) no pudieron consultarse directamente y por tanto, parte de la información contenida en dichos trabajos fue obtenida a partir de otras fuentes documentales. Dado el caso, así se menciona en la bibliografía.

1- ESTUDIOS EN PROTOZOARIOS

El análisis de la bioactividad de las tironinas y otros yodoaminoácidos en organismos unicelulares incluye entre otros a los géneros *Tetrahymena* y *Paramecium*. En la tabla I se resumen los resultados obtenidos a éste respecto y puede apreciarse que en general la adición de extractos desecados de tiroides acelera la división celular, mientras que ésta se retarda con la adición de Tiroxín (extracto hidrolizado y cristalizado de tiroides). Este hecho plantea la duda acerca de si es solamente el mejoramiento del medio nutricional el factor responsable del crecimiento celular. Esta duda ya había sido planteada por Woodruff (1923; cfr Schneider, 1940a). Sin embargo, el mismo Schneider concluye que ambos extractos "ejercen un efecto sobre el proceso metabólico en organismos unicelulares y en las primeras divisiones de otros vertebrados" (Schneider, 1939; cfr Goldsmith, 1949).

La duda anterior persiste aun en los estudios más recientes sobre el particular. Así, Csaba y Németh (1980) analizaron la división celular de *Tetrahymena* en presencia de diferentes compuestos yodados. Los resultados se reproducen en la figura 1, se puede observar que la diyodotirosina (DIT) es el compuesto yodado más potente para inducir el crecimiento. Sin embargo, la única molécula que exhibió una curva dosis-respuesta fue la tirosina, que llegó a inducir el mayor crecimiento de toda la serie experimental. Los autores interpretan que además de existir receptores a moléculas yodadas, existe cierta "inmadurez" en este protozoario ya que exhibe una mayor respuesta a DIT que a T₄. Por otra parte, los resultados muestran que todas las moléculas yodadas, al aumentar su concentración por arriba de 10⁻⁸ M y según la cantidad de tomos de yodo que posean, son tóxicas para las células y producen una disminución del crecimiento.

ESTUDIOS EN METAZOARIOS

Celenterados

Los estudios más sistemáticos sobre los efectos de moléculas yodadas en invertebrados se han llevado a cabo en *Aurelia aurita*. En este celenterado la última fase de desarrollo (estrobilación) consiste en la metamorfosis de pólipo, forma joven del animal, a medusa. La adición de KI o de I₂ disueltos en el medio de cultivo induce la estrobilación, mientras que otros compuestos inorgánicos son inactivos (Spangenberg, 1967). El porcentaje de inducción es dependiente de la dosis de yoduro, ya que a 100 µg/l de KI la estrobilación ocurre en un 95 % de los pólipos, mientras que a 10, 1 y 0.1 µg/l el porcentaje disminuyó al 65 %, 25 % y 0 % respectivamente.

TABLA I EFECTO DE COMPUESTOS YODADOS SOBRE PROTOZOARIOS #

AUTOR	AÑO	SUBSTANCIA	RESULTADOS
Nowikoff	1908	Extracto tiroideo	+
Shumway	1914	Extracto tiroideo	+
		Yodo, DIT	N
Buddington & Harvey	1915	Tiroides de diversos animales	+
Cori	1923	Extracto tiroideo	+
		Tiroxín 1:100,000	?
Woodruff	1923	Extracto tiroideo	N
		Tiroxín	N
Ball	1925	Extracto tiroideo	+
Torrey	1925	Tiroxín 1:100,000	-
		1:1,000,000	-
Csaba & Nemeth	1980	Tiroxina	+
		Dit	+

*Modificado de Goldsmith, 1949; +, Aceleración de la división celular; -, Retardo de la división celular; N, Igual que el control; ?, Cuestionable.

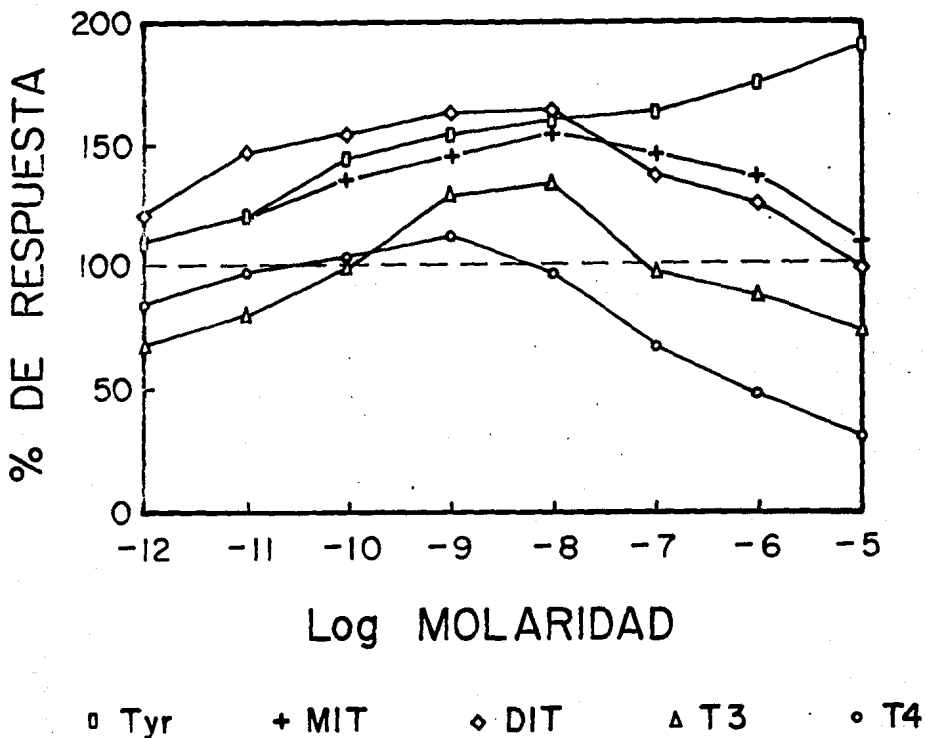


Figura 1. EFECTO DE TIRONINAS Y SUS PRECURSORES EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Tetrahymena*. Se muestra el crecimiento porcentual de los diferentes grupos experimentales (n=20 pozos por dosis y por compuesto) con respecto al control (100%, línea punteada, organismos no tratados). Obsérvese que el mayor crecimiento se obtiene cuando el medio de cultivo contiene DIT o tirosina (Tyr). En el intervalo de concentraciones fisiológicas para vertebrados (10^{-10} M), todos los compuestos ensayados estimulan el crecimiento. En contraste, al aumentar la concentración de 10^{-8} M todas las moléculas yodadas y según el número de tomos de yodo que contengan, provoca una disminución del

En estudios posteriores se observó que otros compuestos yodados, en concentración de 10 µg/ml, también inducen la estrobulación (Spangenberg, 1971). La molécula más efectiva fue DIT, que indujo la metamorfosis en el 100 % de los pólipos en un lapso de 6-7 días. La molécula menos activa fue MIT. El orden de eficiencia de las demás moléculas fue: Yoduro>T₄>T₃>Tiroglobulina.

Por otra parte, estudios de autorradiografía mostraron que el yodo se concentra rápidamente (min) en la epidermis de los pólipos, mientras que la T₄ radiactiva lo hace en la gastrodermis y su acumulación es más lenta (hs). Estos datos explican la diferencia en la velocidad de acción que presenta uno y otro compuesto.

Equinodermos, Crustáceos y Moluscos

Los estudios realizados en estos otros metazoarios no son concluyentes. En la tabla II se resumen los resultados obtenidos en los experimentos realizados a la fecha en estos organismos. Nuevamente se observa que con el empleo de los extractos totales de la glándula (extracto tiroideo o tiroides) se acelera el desarrollo, mientras que ocurre lo contrario al utilizar Tiroxín. Así, en el caso de Torrey (1929), la adición de Tiroxín (dilución 1:50, 000) retardó el desarrollo y división celular de los huevos fecundados de *Echinometra lucunter* (erizo de mar) con respecto a los controles. También se apreció que el efecto dependió de la dosis utilizada (intervalo 1:50,000 - 1:400,000). Finalmente, al sustituir el extracto por KI el efecto no se observó.

Artrópodos (insectos)

Como se resume en la tabla III, entre 1918 y 1940 diversos investigadores estudiaron el efecto que tenía la inyección, o la administración oral, de extractos tiroideos sobre la duración del estadio larvario y sobre el metabolismo o el tamaño del organismo. La mayoría de estos trabajos informan no haber observado ningún efecto. Sin embargo, años más tarde, el análisis crítico de estos estudios permitió a Goldsmith establecer la siguiente conclusión general: "La literatura acerca de los efectos de principios tiroideos en insectos está repleta de contradicciones e inconsistencias.... muchos de los experimentos están sujetos a la crítica, ya que las dosis no fueron adecuadamente controladas." (Goldsmith 1949, pp 294-295).

En apoyo a esta conclusión global conviene destacar los estudios publicados por Kunkel (1918) y por Brannon (1934), en los cuales, como lo demostró posteriormente Schneider, las dosis empleadas tienen un efecto tóxico sobre estos organismos (ver más adelante Schneider, 1940 c). Sin embargo, también es importante reconocer que los trabajos de Alpatov y los del propio Schneider escapan a la bien fundada crítica de Goldsmith.

El primero (Alpatov, 1929 a) que estudiaba las variaciones naturales de las

TABLA II EFECTOS DE TIRONINAS EN
EQUINODERMOS, CRUSTACEOS Y MOLUSCOS #

AUTOR	AÑO	GENERO	SUBSTANCIA	RESULTADOS
EQUINODERMOS				
Bulter	1928	Arbacia	Tyroxin 1:25,000	-
			1:50,000, 1:100,000	-
Torrey	1928	Echinometra	Tyroxin	-
Runnstrom	1929	Antedon	Tyroxin	-
Zavrel	1929	Paracentrotus	Tyroxin	-
Ungar	1933	Psammechinus	Tyroxin	N
			1:50,000-1:800,000	-
			>=1:850,000	+
CRUSTACEOS				
Vecchi	1918	Cyclops	Extracto tiroideo	+
Romeis	1925	Astacus	Extracto tiroideo	N
Banta	1929	Daphnia	Extracto tiroideo	N
Ciabetta	1930	Artemia	Extracto tiroideo	+
MOLUSCOS				
Hykes	1930	Physa	Tyroxin 1:100,000-	?
			1:500,000	?
Susaeta	1930	Barnea	Tyroxin	-
		(huevos)	Tiroides	?+
Chatzillo	1936	Limnea	Tiroides	+

Tomado de Goldsmith, 1949; +, Aceleración del desarrollo; N, Igual que el control; ?, Cuestionable; -, Retardo del desarrollo o división celular.

TABLA III EFECTOS DE TIROIDES FRESCAS Y
EXTRACTOS TIROIDEOS EN INSECTOS#

AUTOR	AÑO	GENERO	SUBSTANCIA	RESULTADO
Kunkel	1918	Lucilia	Tiroides frescas	-
		Calliphora	Tiroides frescas	-
Abderhalden	1919	Deilephila	Tiroides hidrolizada	N
Romeis	1920	Calliphora	Tiroides frescas	-
Kahn	1921	Tenebrio	Extracto Tiroideo	N
Kopec	1924	Lymantria	Tiroides frescas	-
		Pieris	Tiroides frescas	-
Reznitchenko	1926	Drosophila	Tiroides al 5%	N
		Drosophila	Tiroides al 10%	-
Magaudda	1927	Pieris	Extracto Tiroideo*	+
		Pieris	Extracto Tiroideo**	-
Alpatov	1929	Drosophila	Extracto Tiroideo	+
Hahn	1929	Tenebrio	Tiroides frescas	N
		Vanessa	Tiroides frescas	N
Fleischmann	1929	Lymantria	Tiroxin	N
		Celerio	Tiroxin	N
Zavrel	1930	Chironomus	Extracto Tiroideo	N
		Chironomus	Extracto Tiroideo	+
Terao & Wakamori	1931	Bombyx	Tiroides frescas	+
Romeis	1932	Papilio	Tiroxin	N
Koller	1932	Drosophila	Tiroxin	N
Brannon	1934	Lucilia	Tiroides frescas	+
Schneider	1940	Tribolium	Extracto Tiroideo	+

#Modificado de Goldsmith, 1949; -, Retardo de metamorfosis;
N, Igual que el control;*, Tratamiento "corto";**, Tratamiento
"largo"; +, Aceleración de metamorfosis o aumento de tamaño.

larvas de una línea de *Drosophila melanogaster* (mosca de las frutas) utilizó larvas recién eclosionadas durante 67 hs. Su diseño incluyó dos grupos: el experimental creció en un medio de cultivo que contenía tiroides seca de cerdo mezclada con levadura (proporción 1:10 peso/peso, respectivamente), y el grupo control creció en un medio que contenía la misma proporción de músculo desecado de cerdo (Alpatov, 1929 b).

Después de lavar, sacrificar y fijar a las larvas, midió su longitud con un micrómetro. Aunque el autor muestra los resultados de un solo experimento, menciona haber realizado nueve cuyos resultados fueron consistentes entre sí y haber medido casi ocho mil larvas. En el experimento en cuestión, cuyo número de individuos por grupo fue de 400, se observó que la longitud de las larvas alimentadas con tiroides fue mayor que la de las alimentadas con músculo. Por otro lado, este investigador comenta que las larvas alimentadas con tiroides, al desarrollarse a imago (metamorfosis), tuvieron un tamaño menor al de los correspondientes que fueron alimentados con músculo durante su estadio larvario.

Los trabajos más sistemáticos y mejor realizados en esta área están contenidos en la serie de artículos publicados por Schneider (Schneider, 1940 a-e), razón por la cual vale la pena analizarlos con mayor detalle. El control adecuado y sistemático de ciertas variables (densidad poblacional, recambio alimenticio, humedad relativa, temperatura, etc.), el hecho de haber utilizado el número suficiente de individuos (100 ; 250 por grupo experimental), y el análisis de sus resultados desde el punto de vista estadístico, le permitió obtener conclusiones más confiables. El autor trabajó con *Tribolium confusum* (escarabajo de la harina o gorgojo). En sus experimentos alimentó animales con tiroides sólo durante el estadio larvario y analizó la mortandad, la duración del estadio larvario y el peso corporal de las pupas y de los imagos.

La primera serie de experimentos consistió en la alimentación de larvas de *T. confusum* con extracto desecado de tiroides de cerdo, mezclado a diferentes diluciones (1:10,000-1:10) con harina, medio de cultivo habitual para este insecto. Puesto que la alimentación con tiroides aumenta la calidad nutricional del medio de cultivo, el autor incluyó un grupo experimental alimentado con extracto desecado de parótida de cerdo, cuyo contenido de grasa y de proteína es similar al del extracto de tiroides (Schneider, 1940 a).

Sus resultados muestran que en los animales alimentados con extracto tiroideo el período larvario fue menor que en los grupos restantes. El acortamiento del estadio larvario fue dependiente de la dosis del extracto tiroideo en el intervalo 1:10,000 a 1:10, pero no del extracto de parótida en el intervalo 1:100 a 1:10, y se observó incluso con la dosis menor de tiroides (1:10,000). Por otra parte, la variación experimental en el grupo alimentado con tiroides fue menor que en el resto. Este hecho sugiere que la alimentación con tiroides, además de acortar, sincroniza el estadio larvario de estos insectos.

En *Tribolium* el peso corporal tanto de las pupas como de los imagos hembras es mayor que el de los machos de la misma especie, por lo cual, para las comparaciones estadísticas de peso corporal, se separó a los animales por sexo. En comparación con los animales control el peso de las pupas de las larvas alimentadas con tiroides o con parótida

fue mayor en ambos sexos. Sin embargo, sólo en el caso del extracto tiroideo el efecto fue dependiente de la dosis.

Puesto que durante el estadio de pupa los animales no ingieren alimento, el peso corporal de los imagos, forma adulta de estos insectos, fue inferior en todos los grupos experimentales. Sin embargo, el descenso de peso (% de peso corporal perdido) fue directamente proporcional al peso corporal absoluto. Por ejemplo, el porcentaje perdido por las hembras alimentadas con tiroides 1:10 (el grupo con el mayor peso corporal) fue del 16.3%, mientras que en los machos control (los más ligeros) fue de sólo el 8.5%. Por tanto, el efecto de aumento de peso por la alimentación tiroidea se vio disminuido en el estadio de imagos con respecto al de pupas.

Una de las acciones más interesantes de la alimentación con extracto tiroideo en *T. confusum* se observó en los descendientes que no obstante estar alimentados únicamente con harina manifestaron también, aunque en menor cantidad, las características de sus antecesores (Schneider, 1940 b). Este efecto ya había sido observado con anterioridad (Terao y Wakamori, 1931; cfr Schneider, 1940 b) en *Bombyx mori* (gusano de seda). Así, el estadio larvario de la primera generación (F1) de descendientes de animales alimentados con tiroides en proporción 1:10, fue significativamente menor al de los hijos de animales control. Este efecto no se observó en los descendientes de los animales alimentados con parótida 1:10, lo cual apoya la idea de que en este grupo el aumento del desarrollo de los padres fue debido únicamente a la mejor nutrición durante su estadio larvario.

La descendencia de los animales alimentados con tiroides mostró el acortamiento del estadio larvario hasta la generación F3 y este efecto se potencia al alimentar a dos generaciones sucesivas con el extracto tiroideo (Schneider, 1940 d). Además estos efectos son transmitidos de una generación a otra por los insectos antecesores hembras y no por los machos (Schneider, 1940 e). Los efectos "sincronizador" y sobre el peso corporal secundarios a la alimentación con tiroides, se manifestaron hasta la generación F2.

La alimentación con tiroides en proporción 1:5 y 1:2 disminuyó significativamente el peso corporal tanto de las pupas como de los imagos, a la vez que aumentó la mortandad larvaria del 6% (el máximo obtenido en todos los experimentos realizados por el autor), al 13 y 20% respectivamente. Además, con la dosis mayor (1:2), se observó un efecto "paradójico" en la duración del estadio larvario, ya que ésta aumentó significativamente (Schneider, 1940 c). Este efecto también fue "transmitido" a sus descendientes no alimentados con tiroides. Estos resultados permitieron a Schneider concluir que el exceso de tiroides es tóxico para estos animales y brindar una explicación razonable acerca de la inconsistencia de los resultados en la mayoría de los estudios previos (Tabla III). Así, propuso que con concentraciones pequeñas (1:10, 000-1:10) predomina el efecto anabólico, mientras que la alimentación con una concentración intermedia (alrededor 1:5), equilibra los efectos catabólico y anabólico, observándose un estadio larvario igual al del control. Por el contrario, al aumentar la concentración de tiroides (proporción 1:2) el efecto catabólico es mayor que el anabólico, luego entonces la duración del estadio larvario aumenta.

B. METABOLISMO DE YODO EN INVERTEBRADOS

Se sabe que la concentración de yodo en la corteza terrestre es de sólo $6.7 \times 10^{-2}\%$, y en el mar es menor aún, $1.7 \times 10^{-6}\%$. Esta acentuada escasez del elemento, aunada a su importancia como parte constitutiva de las hormonas tiroideas, explica en parte el hecho de que en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha se haya demostrado la presencia de células altamente especializadas en atrapar y organizar el yodo ingerido.

1. ESTUDIOS EN CELEENTERADOS

Una vez más, los estudios más sistemáticos sobre la síntesis de moléculas yodadas en invertebrados se han llevado a cabo en celenterados. Así, la cromatografía de homogeneizados de pólipos expuestos a ^{131}I , precipitados con ácido tricloroacético e hidrolizados con pronasa mostró la presencia de MIT, DIT y T_4 en el sistema sec-butanol: NH_4OH 3% (3:1, v/v) (Spangenberg, 1971). Los cromatogramas del medio de cultivo, no hidrolizado, también mostraron la presencia de T_4 . Sistemáticamente se encontraron, en cuatro sistemas cromatográficos diferentes (NH_4OH : butanol, 1:1; colidina: H_2O , 125:44; butanol saturado de etanol: NH_4OH 2N, 5:12; y alcohol ter-amílico: NH_4OH 26%, 1:1, v/v) además del ya mencionado, "picos" cuyo Rf fue igual al de la T_4 patrón. Sin embargo, otros investigadores (Silverstone y col, 1978) no han confirmado la presencia de T_4 y sólo han observado la presencia de un "pico" cuyo Rf era parecido al de tironinas (T_4 , 3,5-diyodotironina (T_2) y T_3) pero definitivamente no idéntico. Este material se encontró tanto en homogeneizados de pólipos, como en extractos hidrolizados enzimáticamente. Cabe señalar que en este trabajo se empleó un sistema cromatográfico con mayor resolución consistente en butanol: dioxano: NH_4OH 2N (4:1:5, v/v).

Por otro lado Spangenberg (1971) observó que el medio de cultivo en el que se indujo la metamorfosis mediante yoduro es capaz de inducir la estrobilación de otros pólipos, lo cual sugiere la posible función adicional de estas moléculas como ferormonas. Además, la adición de diversos bociógenos inhibió la estrobilación de *A. aurita* (Spangenberg, 1974). Así, al igual de lo que sucede en vertebrados, la presencia de estos agentes redujo la asimilación de yoduro de los pólipos, al mismo tiempo que disminuyó la síntesis de MIT, DIT y T_4 .

2. ESTUDIOS EN INVERTEBRADOS ACUÁTICOS

En 1954 Gorbman y col (Gorbman y col, 1954) agregando al medio ^{131}I y utilizando técnicas autorradiográficas estudiaron la distribución y el metabolismo del isótopo en 22 especies de invertebrados acuáticos, entre las cuales no se incluyeron insectos, aunque sí otros artrópodos. La conclusión general de este trabajo fue que la mayor parte del yodo se acumula y organifica en estructuras escleroproteínicas, tales como el exoesqueleto de los artrópodos; la concha, el manto y las estructuras de anclaje de los moluscos; así como los dientes y la cutícula de los anélidos. En la discusión de estos resultados los autores

comentan: "...que el yodo presente en estructuras u órganos que mudan periódicamente y en compuestos que son extremadamente insolubles hace poco probable que esté disponible para trabajo fisiológico (como endocrina)". (Gorbman y col, 1954, pp.86-87).

Además, en el caso de *Nereis viriens* (un anélido), realizaron el análisis radiocromatográfico, en papel con el sistema butanol: NH_4OH 2N (1;1, v/v), de hidrolizados trípticos de animales expuestos al radioisótopo durante 48-72 hs. En cinco experimentos se observó reproduciblemente la presencia de "picos" radiactivos que correspondían a los Rf(s) de MIT y DIT. Sin embargo, en un solo experimento se observaron trazas de lo que podría corresponder a tiroxina.

Por otro lado en el caso de *Musculium partumeium* (un molusco bivalvo de agua fresca), se observó que el 40% de la radiactividad desaparecía del medio en 65 h. En este experimento, al ser el volumen de los moluscos sólo una centésima parte del volumen total del medio acuoso, es razonable concluir que el organismo concentró activamente el radioisótopo. Posteriormente realizaron análisis cromatográficos de hidrolizados trípticos con el sistema butanol: ácido acético. Así, la fracción soluble de un macerado de estos animales que fueron expuestos durante 96 h al medio radiactivo reveló, además de DIT y de MIT, la presencia de un "pico" que correspondía a T_4 y al 20 % de la radiactividad encontrada. Sorprendentemente, el único comentario que hacen los autores sobre este descubrimiento es el siguiente: "Es un hallazgo muy interesante... la cantidad producida es comparable a la que produciría la glándula tiroidea de un roedor en el mismo tiempo" (Gorbman, 1954, p 87).

3 ESTUDIOS EN INSECTOS

El primer trabajo a este respecto fue realizado por Wheeler (1947). En este trabajo se alimentaron durante 72 hr larvas de *Drosophila gibberosa* (mosca mexicana de las frutas) con ^{131}I mezclado en el medio de cultivo. Posteriormente los animales fueron sacrificados, disectados y se cuantificó la radiactividad en los diferentes órganos con un contador Geiger. Se observó que el 84.2% del isótopo se acumuló en las estructuras esqueléticas de las larvas: mandíbulas, quitina, piel, troncos traqueales y espiráculos. Sin embargo, un 3.6% de la radiactividad se encontraba en las glándulas anulares de la larva que representa sólo la 1/7000 parte del volumen total del animal (Wheeler, 1950).

Los resultados obtenidos con autorradiografía confirmaron y ampliaron los obtenidos con las disecciones. La radiactividad se concentró en la epicutícula, que es una capa delgada del exterior del exoesqueleto. Estos resultados también sugieren que las células que se encuentran bajo esta estructura pueden tener un papel fisiológico en la concentración de ^{131}I .

Esta investigadora también obtuvo evidencias que le permitieron proponer que el yodo radiactivo se había organizado en proteínas. En efecto, mediante la hidrólisis alcalina (KOH al 5 % durante 48 h a 65 °C) de la piel de larvas alimentadas con ^{131}I , la radiactividad se disolvió. Este resultado, así como el hecho de que la quitina no se hidroliza con este procedimiento mientras que las proteínas sí lo hacen (Wheeler, 1947), llevan a la conclusión

En el momento en que ocurre la metamorfosis de larvas alimentadas con el radioisótopo a pupas, se observó que la radiactividad es "abandonada" por la pupa, es decir, queda concentrada en la puparia.

Posteriormente, estos estudios fueron ampliados con análisis radiocromatográficos en papel utilizando fenol saturado con agua como fase móvil. Los hidrolizados de larvas "radiactivas" fueron tratados con $\text{Ba}(\text{OH})_2$, el cual precipita tiroxina. Los resultados mostraron cuatro "picos" radiactivos y la autora propuso que pudieran corresponder a I-, MIT, DIT y I_2 . Sin embargo, en éstos experimentos no se co-cromatografiaron patrones de dichas moléculas.

Entre los trabajos que aportan evidencias de que los insectos organifican yodo destaca el de Limpel y Casida (1957). Estos investigadores realizaron un estudio sobre el metabolismo y distribución de yodo radiactivo en diez especies de insectos, y en particular profundizaron el estudio en *Periplaneta americana* (cucaracha del trópico). Así, después de uno a tres días de haber administrado ^{131}I , los animales fueron sacrificados, hidrolizados y este material se cromatografió en papel con el sistema butanol: ácido acético: agua (79:5:17, v/v). En ocho de las especies estudiadas se observó la existencia de "picos" cuya movilidad radiocromatográfica coincidió con los R_f de los patrones de T_3 y T_4 que son irresolubles en el sistema cromatográfico utilizado.

En cuanto a la distribución del isótopo, en cuatro especies se observó que la mayor proporción del mismo se elimina con la cutícula cuando los animales mudan. En consistencia con este resultado y como se muestra en la tabla X, la cutícula de *P. americana* concentra y organifica la mayor cantidad de ^{131}I 24 hs después de su administración. Sin embargo, al hidrolizar y cromatografiar este material se identificó únicamente la presencia de MIT. En contraste, en los radiocromatogramas de hidrolizados de tejidos parenquimatosos se encontraron picos cuyos R_f correspondieron al de T_3 - T_4 . Los órganos que presentaron mayor proporción de estos compuestos fueron: el tejido graso, el músculo y la notocorda (ver tabla X).

RECAPITULACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pese a la información resumida anteriormente y con la excepción de *A. aurita*, actualmente se da poca importancia a la posibilidad de que en los invertebrados el yodo pudiera organizarse en moléculas que desempeñen la función de un mensajero químico. Así, en los libros de texto contemporáneos sólo se menciona la existencia de yodo organizado en las estructuras escleroproteínicas que conforman el exoesqueleto, soslayando las evidencias que apoyan el probable papel fisiológico como componente fundamental de moléculas yodadas libres en estos organismos (Gorbman, 1978; Taurog, 1974). Nosotros pensamos que esta organización del yodo es factible y esta propuesta constituye la hipótesis general de la presente tesis. A continuación se resumen las principales razones que sustentan dicha hipótesis.

a. No es válido ignorar ni descartar *a priori* los artículos originales viejos (1908-1940) en donde se informan algunos efectos biológicos de extractos tiroideos sobre invertebrados. Los trabajos mejor controlados de esa época en insectos (Alpatov, 1929; Schneider, 1940 a-e), sugieren que la ingestión de extractos tiroideos acorta el estadio larvario y aumenta la talla de los organismos estudiados. Además, los estudios más recientes al respecto (para revisión vease Spangenberg, 1977) brindan evidencias experimentales sólidas en celenterados que confirman la bioactividad de estas moléculas en invertebrados.

b. Aún y cuando estas investigaciones no son concluyentes, tampoco permiten afirmar que: (la tiroxina) "tiene poco o ningún valor fisiológico en invertebrados", como sostienen algunas autoridades en el campo (Gorbman y col, 1954, p 86).

c. Por otra parte, los estudios sobre la organización de yodo en las estructuras escleroproteínicas de diferentes invertebrados son consistentes e indican que sí ocurre dicha organización. Además, estos estudios han mostrado que:

- las estructuras escleroproteínicas son difíciles de hidrolizar.
- el yodo del exoesqueleto se "pierde" en el momento en que los animales mudan, como el caso de la cutícula de los insectos.
- solo existen yodotirosinas.

Estos hechos han llevado a proponer con razonable validez que estas moléculas yodadas tienen poco o nada que ver con la síntesis o bien con la probable función de mensajeros químicos intercelulares, los cuales por definición deben satisfacer la posibilidad de "moverse" y circular dentro del organismo y por tanto, no deben de estar acoplados covalentemente a ninguna estructura sólida.

d. Sin embargo, lo anterior no permite soslayar la importancia que tiene la constante demostración de tirocinas en 10 de las 13 especies de invertebrados estudiadas y no brindar una explicación satisfactoria a la presencia de este compuesto. En efecto, los estudios

encaminados a identificar yodoaminoácidos en los extractos de hidrolizados de tejido parenquimatoso (TP) de diferentes invertebrados han mostrado, sistemáticamente, la presencia de MIT y DIT (Gorbman y col, 1954; Limpel y Casida 1957), y en la mayoría de las especies, pero no en todas, se han identificado tironinas (Gorbman y col, 1954; Limpel y Casida, 1957; Spangenberg, 1971). Esta información plantea la posibilidad de que las moléculas yodadas del TP puedan tener un papel fisiológico como mensajeros químicos. Estas son las moléculas yodadas que pueden estar libres y son éstas las que nosotros nos abocamos a estudiar.

En relación a estas moléculas libres, es importante mencionar que en su artículo, Limpel y Casida comentan: "...es posible extraer cantidades importantes de material radiactivo a partir de macerados frescos de *P. americana* con éter de petróleo" (Limpel y Casida 1957, p 26). Además, estos autores muestran la presencia de MIT en la hemolinfa, así como la excreción de moléculas yodadas "libres" con las heces fecales; sin embargo, en este trabajo no se estudiaron estas moléculas en particular. Por otra parte, el sistema cromatográfico utilizado no tiene resolución para las diferentes tironinas.

OBJETIVO Y ESTRATEGIA

A- OBJETIVO

Demostrar la existencia de moléculas orgánicas yodadas libres en un insecto, por medio de su purificación parcial, e iniciar la caracterización química de las mismas.

B- ESTRATEGIA

1

Como modelo biológico se utilizar el mismo estudiado anteriormente por Limpel y Casida: *P. americana*. Este insecto tiene un alto potencial biótico y una gran resistencia a las manipulaciones experimentales.

2

Para poder identificar pequeñas cantidades de cualquier molécula orgánica yodada libre, sintetizada por los animales, se utilizar como trazador el Na¹²⁵I.

3

Limpel y Casida informan que *P. americana* deja 52% de radioyodo sin organizar a las 24 hs de haber sido inyectado el trazador, por lo cual los tiempos de sacrificio serán mayores a los utilizados por estos autores (11 - 15 días).

4

La metodología de purificación que será implantada no deberá incluir ningún procedimiento que destruya algún enlace covalente, de manera tal que las moléculas aisladas sean libres. Por otra parte, dicha marcha deber proporcionar un material lo suficientemente puro para poder ser analizado con las técnicas cromatográficas que se utilicen.

MATERIALES y METODOS

A- MATERIALES

1 ANIMALES

En abril de 1986 se obtuvo una pequeña colonia de *Periplaneta americana*, gentilmente donada por la Dra. Celina Llanderal Cázares del Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. La colonia consistió en aproximadamente 80 animales de ambos sexos, de los cuales sólo uno era adulto. Las cucarachas se mantuvieron en una caja de acrílico de 40 x 25 x 15 cm, cuyo piso fue forrado con papel sobre el cual se colocaron cilindros de cartón de 4-6 cm de diámetro como habitación de los animales. La caja se mantuvo en el laboratorio a temperatura ambiente (17-22 °C). Tanto el papel como los cilindros de cartón se cambiaron cada dos meses aproximadamente, tiempo en que la humedad carcomía la celulosa.

El agua se les proporcionó *ad libitum* vertiéndola sobre esponjas de hule espuma colocadas sobre un plato de plástico de 10 cm de diámetro. Los animales fueron alimentados con verduras frescas adquiridas comercialmente, principalmente jitomate. El alimento se reemplazó al menos una vez a la semana.

Para los experimentos sólo se utilizaron individuos adultos de 0.5-1.2 g de peso corporal.

2 MATERIAL RADIATIVO

Se utilizó Na¹²⁵I (a e 0.1-0.4 Bq/μg) libre de acarreador. Este isótopo se obtuvo indistintamente de Amersham (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido); o de New England Nuclear (Boston, Mass, USA). De éste último proveedor también se obtuvieron las tironinas marcadas con ¹²⁵I: tiroxina y triyodotironina.

3 PATRONES YODADOS

Se utilizaron T₄, T₃ y 3,5 diyodotironina (T₂) de Sigma (St Louis, Mo, USA); así como 3',5',3-triyodotironina (rT₃) de Calbiochem (La Joya, Calif, USA). Se utilizó también diyodotirosina (DIT) (NBCO, Cleveland, OHIO, USA).

4 SOLVENTES

El metanol, el acetato de etilo, el hidróxido de amonio (26 %) y el cloroformo fueron adquiridos en Merck-México (Méx, México). El n-butanol, el alcohol ter-amílico, el ácido acético y el ácido clorhídrico fueron comprados a Hartman-Leddon (Pennsylvania, Penn, USA) o a Baker-México (Tlax, México).

5 REACTIVOS

Se utilizaron cloruro de calcio e hidróxido de sodio (Merck- México); citratos y fosfato de sodio tanto monosódico como disódico (Baker-México, Tlax, México). La 4-aminopiridina, el ferrocianuro de potasio y el cloruro de paladio fueron adquiridos en Sigma (St Louis, Mo, USA). La glicina fue comprada en Merck (Darmstad, Alemania).

6 EQUIPO

Conteo radiactivo. La emisión gamma fue cuantificada en un espectrómetro gamma de centelleo Packard, modelo 5120, con una eficiencia que osciló del 10% al 20%.

Agitador tipo Vortex.

Sonicador. Se utilizó un limpiador Branson de ultrasonificación.

Cámaras de cromatografía

7 SOLUCIONES

Solución madre de NaOH(10M). Se pesaron 40 g de NaOH y se disolvieron en agua destilada. Se aforó a 100 ml y se guardó desgasificada a temperatura ambiente en un recipiente de plástico. A partir de la solución madre y para cada experimento se prepararon las soluciones 0.015 M y 0.02 M.

Acido acético 1 y 1.1 M. Se prepararon con 572 y 629 ul, respectivamente, de ácido acético glacial que fueron aforados a 10 ml con agua destilada. Generalmente estas soluciones se prepararon el mismo día en que se realizó cada experimento.

Amortiguador CaCl₂ 0.5%, gli-NaOH 0.2 M pH 9.6 (Sol 1). Se pesaron 0.165 g de CaCl₂ y 0.375 g de glicina. Se disolvieron en 15 ml de agua destilada. Posteriormente su pH se ajustó a 9.6 con NaOH 10 M y fue aforado a 25 ml con agua destilada. A partir de esta solución se preparó la solución de CaCl₂ 0.05%, gli-NaOH 0.02 M.

NH₄OH 2 M. Un volumen de 1.35 ml de una solución NH₄OH al 26 % fue aforado a 10 ml con agua destilada. Esta solución fue preparada el mismo día del experimento o guardada en refrigeración o congelación. La solución inicial al 26 % fue fraccionada en volúmenes de 10 ml aproximadamente y guardada en el congelador para evitar su evaporación.

Amortiguador de fosfatos en solución salina (PBS). Se pesaron 2.76 g de NaH₂PO₄ H₂O, 2.84 g de Na₂HPO₄ y 5.84 g de NaCl; se disolvieron en agua por separado y se aforaron cada una 100 ml. Posteriormente se mezclaron 7.65 ml, 6.35 y 15 ml de las soluciones de NaH₂PO₄ H₂O, Na₂HPO₄, y NaCl, respectivamente y se aforaron de nuevo a 100 ml para una concentración final de fosfatos 0.015 M, NaCl 0.15 M y un pH de 6.8. Esta última solución se congeló a -20° C.

4-aminopiridina 2.5% Se pesaron 5 g de 4-aminopiridina y 5 g de NaHCO₃. Ambos compuestos se mezclaron disolviéndose en agua y se aforaron a 200 ml.

K₃Fe(CN₆) 2 % Se pesaron 4 g de K₃Fe(CN₆) y se disolvieron en 200 ml de agua. Esta solución se almacenó en la oscuridad.

PdCl 0.5% Se disolvieron 500 mg de PdCl en 5 ml de HCl 2 M y se aforaron a 100 ml con agua.

B- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

1 ADMINISTRACIÓN DEL ISÓTOPO

Los animales fueron anestesiados con CO₂ haciendo burbujear hielo seco en agua potable a temperatura ambiente, en un kitasato tapado y conectado a una manguera de hule. El ¹²⁵I se disolvió en PBS pH 6.8. Las dosis utilizadas variaron de 6 a 16 x 10⁶ cpm en un volumen no mayor de 10 µl. La inyección del isótopo se realizó utilizando una jeringa Hamilton de 10 µl, introduciendo la aguja entre los terguitos dorsales 4° y 5° en el lado derecho del corazón. Después de la inyección los animales se mantuvieron en ayuno, al menos durante 12 horas. Además, y hasta su sacrificio, se mantuvieron separados de la colonia en una caja de acrílico circular de 30 cm de diámetro por 7 cm de alto en las condiciones previamente indicadas.

2 COLECCIÓN DE HEMOLINFA

Los animales fueron anestesiados con corriente de CO₂, de la manera ya mencionada, y mantenidos a 4 °C por lo menos durante 10 min. Al término de ese lapso se sacrificaron por decapitación y la hemolinfa fue colectada en tubos eppendorf de 0.5 ml y congelada hasta su uso.

3 DISECCIÓN

Para reducir al máximo la descomposición rápida que caracteriza a estos organismos, el cuerpo de los animales sacrificados se congeló inmediatamente con hielo seco. La disección se llevó a cabo mientras los tejidos se descongelaban a temperatura ambiente con la ayuda de tijeras y pinzas de disección. Inicialmente se cortaron las alas y la cabeza, mismas que se desecharon después de cuantificar su radiactividad. Posteriormente se separó, lo mejor posible, el tejido blando del abdomen (constituido principalmente por vísceras y tejido graso) y los músculos del tórax y patas. Estos órganos constituyen la fracción denominada tejido parenquimatoso (TP) y el resto, el exoesqueleto o cutícula. Durante la realización de este procedimiento no se observó la pérdida de hemolinfa.

4 MACERACIÓN

A la fracción TP se agregó entre 2 y 4 ml de NaOH 0.015 M por cucaracha. Con la ayuda de un homogeneizador de émbolo de teflón se terminó de separar manualmente los pequeños restos de tejido cuticular. Al bajar lentamente el émbolo estos remanentes quedan en el fondo del homogeneizador, mientras que el tejido parenquimatoso se macera y queda arriba del émbolo. Este sobrenadante macerado se aspiró con pipeta Pasteur.

Los restos de tejido cuticular se juntaron con el exoesqueleto disectado inicialmente (que contiene restos de tejido parenquimatoso) y se lavaron tres veces consecutivas con un volumen entre 0.5 y 1.5 ml de NaOH 0.015 M. En cada lavado se sonicaron 5 min. Estos lavados del tejido cuticular fueron juntados con el tejido macerado para conformar la fracción TP. El pH final de esta mezcla fue de 7 a 8.5.

5 HOMOGENEIZACIÓN

El pH de la fracción TP fue ajustado a 8.5-10.5 con NaOH 10 M. Se midió su volumen y se agregó 1:9 (v/v) de sol 1 para una concentración final de CaCl_2 0.05%, Gli-NaOH 0.02 M pH 9.6. Las muestras se homogeneizaron, esta vez con un rotor eléctrico en el homogeneizador de émbolo de teflón.

6 PREPARACIÓN DE LA HEMOLINFA

Después de descongelar las muestras a temperatura ambiente, se centrifugaron a 267 x g por 10 min. Se tomó el sobrenadante. Si el precipitado tenía mucho volumen se le agregó una pequeña cantidad de NaOH 0.015 M, se agitó levemente, se repitió la centrifugación y se tomó nuevamente el sobrenadante.

7 PURIFICACIÓN/EXTRACCIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS

Los homogeneizados de la fracción TP se deslipidizaron dos veces con cloroformo y posteriormente se llevaron a pH 4 con ácido acético para ser extraídos (dos veces) con acetato de etilo: butanol (9:1, v/v). En el caso de la hemolinfa solamente se realizó la extracción de la fase acuosa sin la deslipidización previa. Puesto que estos procedimientos fueron objeto de optimización, en la sección de resultados se explican en mayor detalle.

C- MÉTODOS ANALÍTICOS

CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA.

Se siguió el método de Osborn y Simpson (1969), con algunas modificaciones. Para aplicar las muestras, se concentraron los extractos orgánicos bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen menor a los 200 μ l. Se transfirieron a tubos eppendorf y se terminaron de secar bajo corriente de nitrógeno. Las muestras se resuspendieron en etanol: NH_4OH 2 N (1:1, v/v) y se centrifugaron 1 min a 67 x g para concentrar las muestras en el fondo del tubo. El sobrenadante fue aplicado en punto o en banda con tubos capilares bajo corriente de aire sobre placas de sílica gel (Eastman Kodak 13179, Rochester, N. Y., USA), secadas previamente al horno a 80 °C por 30 min.

En cada cromatografía también se aplicaron, utilizando la misma placa pero en carriles paralelos, patrones de moléculas yodadas. En el caso de patrones radiactivos (Na^{125}I), se usó además 5 μ g de KI como acarreador. Para todos los demás patrones yodados (DIT, rT3, T4, T3 y T₂) se utilizaron 5 μ g de cada uno disueltos en etanol: hidróxido de amonio 2 N (1:1, v/v).

Se corrieron las cromatografías en forma ascendente con el sistema cloroformo: metanol: NH_4OH 26% (100:50:5, v/v) hasta que el frente recorrió 16 cm aproximadamente. Las placas se secaron a temperatura ambiente. Cada uno de los carriles que contenían muestras radiactivas fueron recortados en sentido longitudinal. Posteriormente se recortaron en sentido transversal en fracciones de 0.5 cm para ser contada su radiación gamma. Los resultados se expresan como el porcentaje de radiactividad obtenido en cada fracción del total de radiactividad aplicada en el carril. Las yodotironinas y yodoaminoácidos fueron revelados rociando la placa con ninhidrina al 0.25% (p/v) en acetona (Roche y col, 1954).

CROMATOGRAFÍA DESCENDENTE EN PAPEL.

Las cromatografías se realizaron siguiendo el método de Nakamura y col (1977) con modificaciones mínimas y empleando el sistema NH_4OH 2 N: alcohol ter-amílico: hexano (6:5:1, v/v). Esta técnica se optimizó agregando entre 5 a 10 ml de NH_4OH 26% a las paredes de la cámara. Para su aplicación las fases orgánicas fueron concentradas hasta un volumen menor a los 100 μ l y directamente aplicadas en banda bajo corriente de aire sobre tiras de papel filtro No. 3 (Wathman 3030917, Reino Unido) de 2.5 cm de ancho.

En cada experimento y en tiras paralelas se aplicaron patrones radiactivos (T_1 y $Na^{125}I$) y 20 μg de cada uno de los siguientes patrones: DIT, rT_1 , T_1 , T_2 y eventualmente KI, disueltos en etanol: NH_4OH 2 N (1:1, v/v).

Durante las cromatografías los frentes recorrieron alrededor de 30 cm y después las tiras se secaron y dejaron secar. Las moléculas yodadas no radiactivas fueron reveladas fijando la tira con 4-aminopiridina al 2.5% y rociándola con $K_3Fe(CN_6)$ al 2%. Para observar KI, la placa fue rociada además con $PdCl$ 0.5%. Por otro lado, las tiras que tuvieran muestras radiactivas fueron recortadas transversalmente en fracciones de 1 cm de ancho y se cuantificó su emisión gamma. Los resultados se expresan igual que en las radiocromatografías en placa fina.

D- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En el caso del análisis de la distribución endógena porcentual de radioyodo, los resultados fueron transformados a su logaritmo (ver tabla V) para posteriormente realizar regresiones lineales simples con la ayuda del paquete estadístico Statgraphics (STSC Inc, Statistical Graphics Corporation, USA).

Los demás resultados fueron analizados con base en las siguientes ecuaciones:

-para el Promedio:

$$\bar{X} = \sum X_i / n$$

-para la Desviación Estándar:

$$DE = \sqrt{(\sum X_i - \bar{X})^2 / n - 1}$$

Siendo X_i el resultado individual de cada uno de los eventos y n el número de eventos por grupo.

Se aclara que únicamente se anotar el valor del promedio, seguido por el signo + para señalar la Desviación Estndard (DE) obtenida.

-para el coeficiente de variación (CV) expresado en porcentaje:

$$CV = DE / \bar{X} \cdot 100$$

-para el error estándar (E E):

$$EE = DE / \sqrt{n}$$

RESULTADOS

A- OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE EXTRACCION/PURIFICACION

I DESLIPIDIZACION

En experimentos preliminares observamos que al extraer los homogeneizados de tejido parenquimatoso (TP) con cloroformo, se formaba una interfase muy espesa, a causa de que las cucarachas contienen una gran cantidad de tejido graso. Este hecho nos llevó a optimizar la proporción necesaria del solvente para disolver los lípidos, modificando el método de Gordon y col (1982). Las modificaciones consistieron en: emplear solamente cloroformo, llevar a cabo el procedimiento en un pH alcalino y utilizar cloruro de calcio (CaCl_2). Al trabajar en un pH de 9.6 intentamos solubilizar las yodotironinas, ya que se asegura la disociación de los grupos hidroxilo y carboxilo y se evita la de los grupos amino (Jorgensen, 1978). Así, se generaría una carga neta negativa en estas moléculas que aumentaría su solubilidad. La adición de CaCl_2 al 0.05% ayuda a disminuir la solubilidad de los gangliósidos en agua, lo cual aumenta su incorporación a una fase orgánica (Folch y Lees, 1951).

Experimento I

A un homogeneizado de dos cucarachas hembras adultas se le agregó CaCl_2 0.05% (concentración final) y el pH se ajustó a 9.5 con NaOH. Posteriormente se le agregó $^{125}\text{I-T}_4$ como patrón (aproximadamente 24,000 cpm) y se fraccionó en volúmenes de 2 ml ($n = 5$). A cada una de estas fracciones se les agregó diferentes proporciones de cloroformo (1:0 - 1:8, v/v). Se agitaron 5 min en vortex y se dejaron reposando 2 hr a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron 30 min a 1,100 x g. Se formaron dos fases: una superior, acuosa, que contiene sales y compuestos de bajo peso molecular donde quedan las moléculas de nuestro interés; una interfase, formada probablemente por macromoléculas desnaturalizadas, lípidos y detritus celulares; y una fase inferior orgánica con lípidos y lipoproteínas disueltas (Gordon y col, 1982). Se calculó el volumen de la interfase utilizando la fórmula $V = r^2 \times h$, donde h es el grosor de la interfase y r el radio del tubo cilíndrico utilizado. Se tomó el sobrenadante (acuoso) y se cuantificó su emisión gamma. Se calculó el porcentaje que éste representaba con respecto al total inicial agregado. Los resultados se muestran en la figura 2 y es claro que el cloroformo en proporción 1:4 solubiliza los lípidos y permite recuperar el 55 % del trazador. Aunque la proporción 1:8 del solvente solubiliza aún más los lípidos, la recuperación disminuyó al 48%. Por esta razón se escogió la proporción de cloroformo 1:4 y se decidió llevar a cabo un lavado de la interfase con 2 ml de CaCl_2 . En esta forma la recuperación final osciló entre 76 a 90 %.

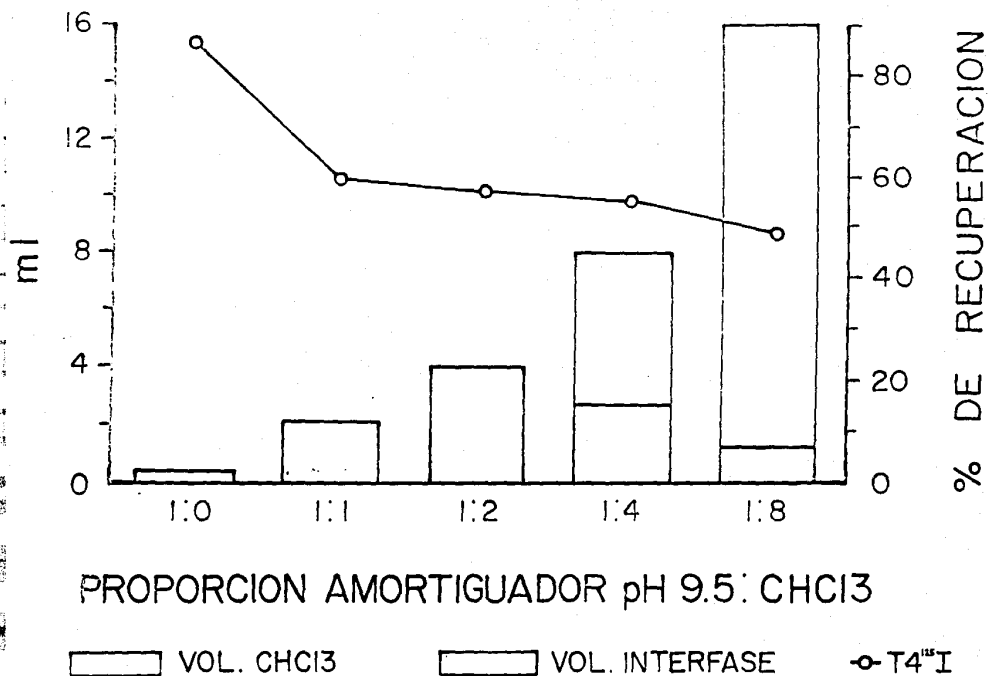


FIGURA 2. EFICIENCIA DE EXTRACCION CON DIFERENTES PROPORCIONES DE CLOROFORMO: AMORTIGUADOR A pH 9.5 Los resultados se expresan en % de recuperación del patrón radiactivo y en ml de interfase. El volumen de esta última se calculó como se indica en el texto. En el eje de las abscisas se indican las proporciones CHCl₃: amortiguador. Obsérvese que solamente las proporciones 1:4 y 1:8 solubilizan los lípidos.

2- EXTRACCIÓN DE LA FASE ACUOSA

El material, resultado de concentrar a sequedad el sobrenadante acuoso deslipidizado, es muy difícil de aplicar en los sistemas cromatográficos utilizados. Para eliminar las sales y proteínas presentes en esta preparación se siguió el procedimiento descrito por Bianchi y col (1984) que utiliza acetato de etilo:butanol (9:1, v/v) para extraer diferentes tironinas disueltas en solución salina. Sin embargo y con el propósito de obtener un máximo de radiactividad, optimizamos el pH de esta técnica y además ensayamos otros solventes.

Experimento II Optimización del pH

Una cucaracha hembra y otra macho fueron sacrificadas 12 días después de inyectado el ¹²⁵I. Se disectaron, homogeneizaron y deslipidizaron como se describió anteriormente. El sobrenadante acuoso resultante se fraccionó en volúmenes de 0.9 ml y se ajustaron a diferentes pHs con los siguientes amortiguadores: pH 9.5 (Gli-NaOH 0.02 M y NaCl 0.133 M) ó pH 7.5 (fosfatos 0.133 M y HCl 0.02 M); pH 5.5 (citratos 0.06 M, NaCl 0.04 M; HCl 0.02 M) y pH 3.5 (ácido acético, 0.2 M). Todas las fracciones se aforaron a un volumen de 1.5 ml. La molaridad indicada es la concentración final obtenida. Posteriormente se le agregó acetato de etilo:butanol (9:1, v/v) en una proporción de (2:1, v/v). Las muestras se agitaron 5 min, se dejaron reposando 1 h a 4° C y se centrifugaron 10 min a 1000 x g. Se formaron 2 fases: una acuosa, inferioró una pequeña interfase, compuesta de proteínas; y una fase orgánica superior (Bianchi y col, 1984). Se separaron las fases y se cuantificó por duplicado su emisión gamma. Como se puede observar en la figura 3, el porcentaje de extracción de los compuestos radiactivos es inversamente proporcional al pH.

Experimento III Utilización de Diferentes Solventes

Dos cucarachas adultas, una hembra y otra macho, se sacrificaron a los 14 días postinyección de ¹²⁵I. Se procesaron, como se describe en material y métodos, hasta obtener un sobrenadante acuoso deslipidizado en CaCl₂ 0.05%, Gli-NaOH 0.02 M pH 9.6. El material se fraccionó en volúmenes de 1.1 ml y se le agregó 0.11 ml de ácido acético 1 M para un pH final de 4.

A cada fracción se le agregó 2:1 (v/v) de los siguientes solventes orgánicos o sus mezclas: éter, butanol, butanol:acetato de etilo (1:1, v/v), acetato de etilo:butanol (9:1, v/v) y acetato de etilo. El butanol había sido previamente saturado con ácido acético 0.1 M en proporción 1:4 (v/v) utilizando la misma metodología para las extracciones.

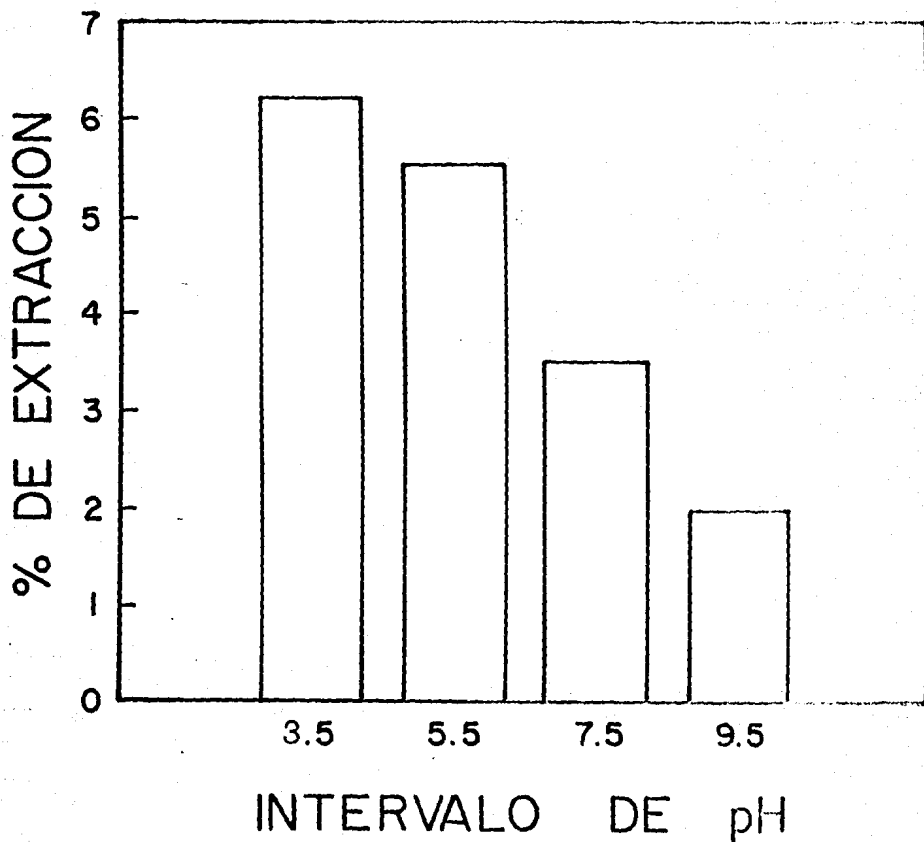


FIGURA 3. OPTIMIZACION DEL pH DE EXTRACCION PARA MOLECULAS RADIOYODADAS DE LA FASE ACUOSA DESLIPIDIZADA. El 100% de la radiactividad es la suma de la fase orgánica más la acuosa. Los resultados se expresan como el porcentaje de radiactividad extraída por el solvente orgánico. Es claro que la eficiencia es mayor a pHs menores de 5.5 y que esta casi se duplica con respecto al intervalo 7.5 - 5.5 que corresponde al pK del anillo externo de las moléculas de tironinas (fenolato).

La extracción se realizó como se indica en el experimento II sólo que se repitió una 2ª vez. Los cálculos también fueron iguales a los del experimento mencionado solo que el porcentaje de radiactividad en la fase orgánica es la suma de la radiactividad en ambas extracciones. Los resultados se muestran en la figura 4 y se puede observar que el extracto butanólico contiene el mayor porcentaje de radiactividad (20%) y que el menor porcentaje se extrae con éter (3%). Sin embargo, al concentrar el extracto butanólico y al aplicarlo a una cromatoplaqueta de sílica gel, se presentaron problemas metodológicos: el material contenía agua que se evaporaba con dificultad y era tan heterogéneo que no se incorporaba a la placa adecuadamente. Lo mismo sucedió con el extracto de butanol:acetato de etilo (1:1, v/v). Por tanto, también el corrimiento cromatográfico fue irregular (figura 5).

Por lo que respecta al extracto con acetato de etilo la eficiencia fue sensiblemente menor (4 veces) a la obtenida con butanol puro o con acetato de etilo (1:1, v/v). Sin embargo, como se muestra en la figura 6, la cromatografía en placa fina de este extracto se resolvió en un solo componente o pico mayoritario con un R_f de 0.437 el cual se designó como desconocido placa 1 (Des Pc 1).

En conclusión, se decidió utilizar el sistema de solventes butanol:acetato de etilo (9:1, v/v) puesto que extrae una cantidad suficiente de material radiactivo a la vez que exhibe un menor grado de impurezas con respecto al extracto butanólico. Por lo anterior, la extracción de la fase acuosa la realizamos a pH 4 utilizando acetato de etilo:butanol (9:1, v/v).

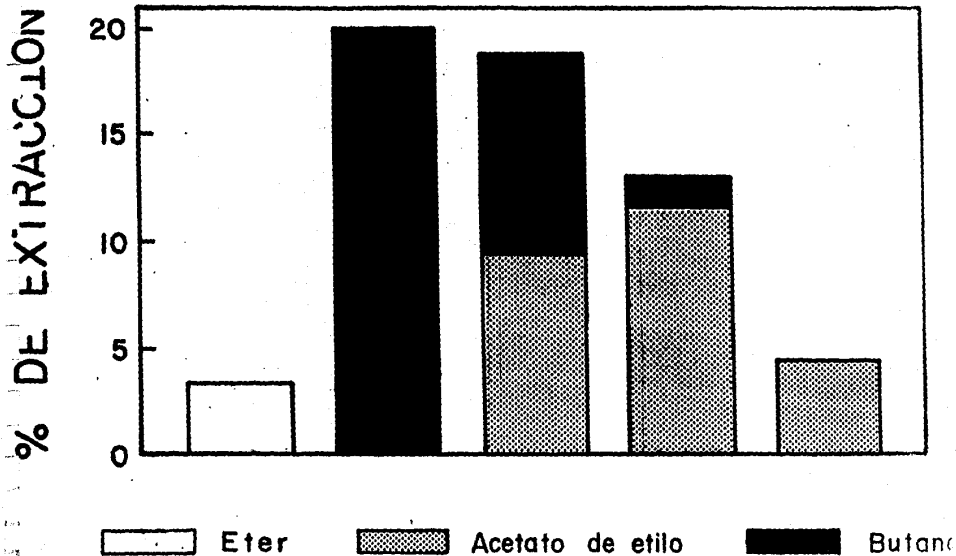
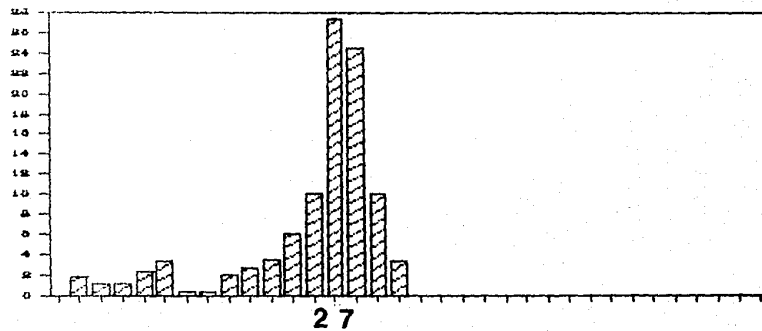
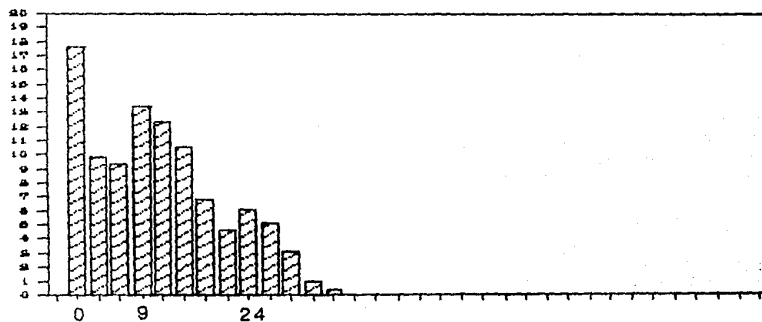
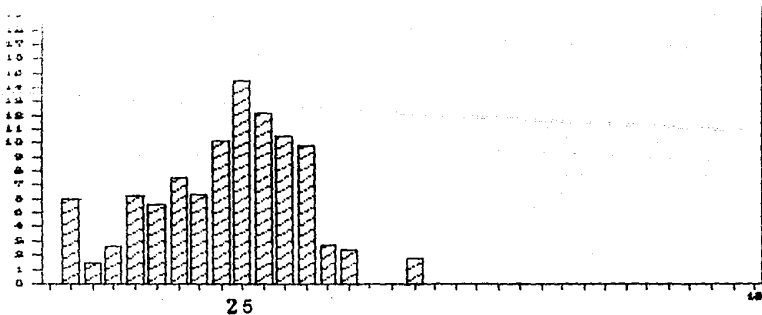


FIGURA 4. COMPARACION DE DIFERENTES SOLVENTES EN LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE MOLECULAS RADIOYODADAS A pH 4. El porcentaje est referido al total de radiactividad existente en el extracto acuoso (100%). Es claro que la presencia de butanol mejora la eficiencia de extracción.

% DE RADIATIVIDAD



Rf x 100

FIGURA 5. RADIOCROMATOGRAMAS EN PLACA FINA DEL MATERIAL EXTRAIDO CON BUTANOL. Los tres paneles corresponden a otros tantos extractos obtenidos con butanol. Obsérvese la falta de reproducibilidad entre los tres cromatogramas y las dificultades de corrimiento.

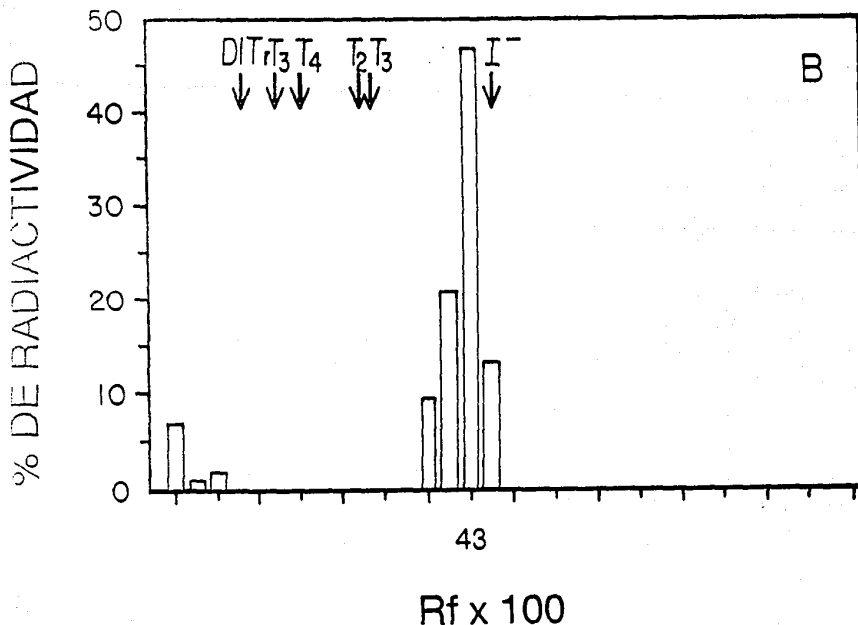


FIGURA 6. RADIOCROMATOGRAMA DE UN EXTRACTO OBTENIDO CON ACETATO DE ETILO. Se muestra el patrón radiocromatográfico de un extracto obtenido con acetato de etilo puro. Obsérvese la presencia de Des Pc 1 sin otro contaminante radiactivo. Sin embargo, la eficiencia de extracción de este solvente es muy baja.

Eficiencia de la Extracción/Purificación. En la tabla IV se presenta la distribución porcentual de la radiactividad detectada en el extracto acuoso (EA) y la interfase (ITF) con respecto al 100% presente en TP. Puede observarse que consistentemente la ITF contiene un porcentaje de radiactividad insoluble que oscila entre 5% a 21%, mientras que el EA contiene entre 4 a 7 veces más. Así mismo, la suma de la radiactividad detectada en ITF y EA no llega al 100% por lo que la restante (12 a 49 %) quedó disuelta en el cloroformo junto con lípidos y lipoproteínas.

En la tabla V se muestra la selectividad de extracción del acetato de etilo:butanol (9:1, v/v) como el porcentaje de radiactividad obtenida en el solvente orgánico con respecto al total contenido en el EA o en la hemolinfa. Se puede apreciar que el procedimiento utilizado extrae preferencialmente las moléculas que se pretende purificar, ya que el porcentaje de recuperación de la T₄ patrón añadida a TP fue de 73.4 ± 1.4 %, mientras que el del yoduro fue significativamente menor (2.2 ± 1.5 %). Al incrementar el intervalo de sacrificio post-inyección (11 - 15 días), el porcentaje de radiactividad extraída aumenta y en el caso de la hemolinfa este fue hasta del 27%.

TABLA IV DISTRIBUCION DE RADIOYODO (CUENTAS POR MINUTO[^] y PORCENTAJE) EN EL EXTRACTO ACUOSO DESLIPIDIZADO (EA) Y LA INTERFASE (ITF).

DIAS	CUENTAS POR MINUTO [^]			PORCENTAJES			
	TP	100%*	EA	ITF	TP/100%	EA/TP	ITF/TP
1	498180	3471649	305610	50700	14.3	61.3	10.2
11	720815	3420716	514151	34975	21.1	71.3	4.9
12	688390	4318059	238367	145826	15.9	34.6	21.2
12	513113	5727342	271183	30002	9.0	52.9	5.8
13	208561	3864409	107107	10954	5.4	51.4	5.3
13	225595	4134977	119414	10987	5.5	52.9	4.9
13	693265	6807590	548755	48096	10.2	79.2	6.9
14	135967	4984861	57187	15756	2.7	42.1	11.6
14	293825	4099342	241533	14271	7.2	82.2	4.9
35	67279	1559591	35897	7214	4.3	53.4	10.7
35	216568	5329826	89907	20760	4.1	41.5	9.6
58	235031	2229184	147232	23598	10.5	62.6	10.0
58	85138	1017598	39121	5825	8.4	46.0	6.8
PROMEDIO					9.1	56.3	8.7
E E					1.4	3.9	1.2

[^] Extrapolado a cuentas por minuto totales; TP, Tejido parenquimatoso; * 100% = Total de radiactividad en el individuo (Demás compartimientos véase tabla VI); E E, Error estándar.

Tabla V SELECTIVIDAD DE EXTRACCION DE TIRONINAS O RADIOYODO EN TEJIDO PARENQUIMATOSO Y/O HEMOLINFA

Compuesto	Admon.	N	% (± DE)	Tiempo*
T ₄	A	2	73.4 (1.4)	0
Yodo	I	3	2.2 (1.5)	10 min
Yodo	A	3	3.8 (1.7)	0
Yodo	I	12	14.7 (3.1)	11-15 días
Yodo @	I	3	26.7 (0.7)	11-15 días

DE, Desviación Estandar; A, Agregado al Extracto acuoso; I, Inyectado in vivo; *, Sacrificio post-inyección; @, Extraído de Hemolinfa.

3 PROTOCOLO FINAL

Deslipidización. A cada homogeneizado acuoso de TP se le agregó cloroformo 1:4 (v/v). Se agitó 5 min y se dejó reposando por lo menos 3 h a 4 °C (ver más abajo). Las muestras se centrifugaron 30 min a 1000 x g. La fase inferior-orgánica se desechó, se retuvo la interfase y la fase acuosa se sometió a una segunda extracción con cloroformo 1:1 (v/v), con el mismo procedimiento, pero sólo centrifugando 10 min. Rutinariamente y dependiendo de la hora en la que se iniciaba el procedimiento, indistintamente una de las dos extracciones se dejaba reposar toda la noche mientras que la otra al menos 3 horas. En esta segunda extracción se obtiene una interfase de menor volumen.

Las interfases se juntaron para hacer un lavado con 1 ml de CaCl_2 0.05%, Gli-NaOH 0.02 M pH 9.6, utilizando el procedimiento descrito anteriormente y centrifugando 30 min.

Las fases acuosas resultantes se almacenaron individualmente en congelación a -20 °C, por un período no mayor a 5 semanas, hasta su uso. En el caso de la hemolinfa ésta deslipidización no se llevó a cabo.

Extracción de la Fase Acuosa. El pH de las muestras fue ajustado a 4 con ácido acético 1 M o 1.1 M. Generalmente se utilizó una concentración final de 0.1 M de ácido acético. Se agregó un volumen 2:1 (v/v) de acetato de etilo:butanol (9:1, v/v). Se agitaron las muestras 5 min y se dejaron reposando al menos 1 h a 4 °C y se centrifugaron 10 min a 1000 x g. La fase orgánica se removió por aspiración y se repitió la extracción de la fase acuosa. Las fases orgánicas se concentraron bajo corriente de nitrógeno.

B- RESULTADOS EXPERIMENTALES

1 DISTRIBUCIÓN ENDÓGENA DEL YODO

Por las limitaciones inherentes al manejo de animales inyectados con yodo radiactivo, estos experimentos se llevaron a cabo a lo largo de un año (abril de 1987 a mayo de 1988). Se utilizaron en total 15 individuos adultos (8 hembras y 7 machos). Todos fueron inyectados con Na^{125}I según se describe en la sección de procedimientos experimentales. La actividad específica del radionúclido osciló entre 0.1 a 0.4 Bq/ μg . Diez de los animales se sacrificaron entre los días 11 a 15 postinyección del isótopo y cinco se sacrificaron a intervalos más amplios (días 21 a 58).

La tabla VI resume los resultados individuales de la radiactividad detectada (cpm) en cada uno de los tres compartimentos (hemolinfa, cutícula o exoesqueleto, y tejido parenquimatoso) a los diferentes días post-inyección. Independientemente de la variación interindividual que muestra la radiactividad total (100 %) y que puede ser secundaria a la eficiencia de la inyección del trazador, obsérvese que para un tiempo determinado, el porcentaje para cada compartimiento es menos variable. Esta transformación de los

resultados permitió hacer un análisis preliminar de la distribución y cinética del trazador. Con este mismo propósito y utilizando el logaritmo de estos datos se calcularon y ajustaron las regresiones lineales cuyos resultados aparecen en la tabla VII.

TABLA VI RADIATIVIDAD DETECTADA* (cpm), DISTRIBUCION PORCENTUAL[^] Y LOGARITMICA EN *P. americana* @

DIAS	COMPARTIMIENTOS*				TP	PORCENTAJES [^]			LOGARITMOS@	
	T P	Hemo	Cut	100%		Hemo	Cut	TP	Hemo	Cut
11	498180	19784	2953685	3471649	14.3	0.6	85.1	1.16	-0.24	1.93
11	720815	26016	2673885	3420716	21.1	0.8	78.2	1.32	-0.12	1.89
12	688390	0	3629669	4318059	15.9	0.0	84.1	1.20		1.92
12	513113	29729	5184500	5727342	9.0	0.5	90.5	0.95	-0.28	1.96
13	208561	26458	3629390	3864409	5.4	0.7	93.9	0.73	-0.16	1.97
13	225595	53265	3856117	4134977	5.5	1.3	93.3	0.74	0.11	1.97
13	693265	24450	6089875	6807590	10.2	0.4	89.5	1.01	-0.44	1.95
14	135967	25894	4823000	4984861	2.7	0.5	96.8	0.44	-0.28	1.99
14	293825	1545	3803972	4099342	7.2	0.0	92.8	0.86	-1.42	1.97
15	319780	22183	7530550	7872513	4.1	0.3	95.7	0.61	-0.55	1.98
21	165060	4827	4237960	4407847	3.7	0.1	96.1	0.57	-0.96	1.98
35	67279	840	1491472	1559591	4.3	0.1	95.6	0.63	-1.27	1.98
35	216568	2688	5110570	5329826	4.1	0.1	95.9	0.61	-1.30	1.98
58	235031		1994153	2229184	10.5		89.5	1.02		1.95
58	85138		932460	1017598	8.4		91.6	0.92		1.96

* Extrapolado a Cuentas Por Minuto totales; [^]100%= Total de radiactividad en el individuo; @ Logaritmo10 del porcentaje;
TP, Tejido Parenquimatoso;
Hemo, Hemolinfa; Cutic, Cuticula.

TABLA VII REGRESION LINEAL SIMPLE DEL Log DE LA DISTRIBUCION PORCENTUAL DE YODO

TEJIDO	N	PENDIENTE	C	CORRELACION	P (F)
Parenquimatoso ^a	10	-0.1797	0.84	0.002	(19.7)
Parenquimatoso*	5	0.0120	0.95	0.013	(27.8)
Cuticular ^a	10	0.0188	0.85	0.001	(20.8)
Cuticular*	5	-0.0008	0.91	0.027	(16.4)
Hemolinfa [^]	12	-0.0439	0.72	0.007	(11.3)

P (F), Significancia del modelo y F correspondiente;
^a Días 11-15 Post-inyección; * Días 21-58 Post-inyección;
[^] Días 11-35 Post-inyección.

La figura 7 muestra la distribución porcentual de la radiactividad en los diferentes compartimentos analizados. Como puede apreciarse, en la hemolinfa (panel A), compartimento en el cual se inyectó el radioisótopo, este exhibe una caída exponencial con respecto al tiempo. Así, el logaritmo del porcentaje de radiactividad presente en este compartimento se ajusta a una línea recta de pendiente negativa ($m = -0.043$). Así, al cabo de 11 días postinyección la radiactividad en hemolinfa corresponde solamente al 0.7 % de la total y tiende al cero.

Por otro lado, puede observarse que el tejido cuticular (panel B) es el compartimento que acumula más radiactividad, hasta llegar a una meseta en el día 15 aproximadamente. Durante este período el logaritmo del porcentaje de radiactividad presenta una pendiente positiva ($m = 0.018$). Después del día 21 se observa una pérdida lenta de radiactividad en este tejido ($m = -0.0008$).

En el tejido parenquimatoso (panel C) se observa una caída inicial del isótopo parecida a la que exhibe la hemolinfa. Sin embargo la desaparición del isótopo en TP parece ser más rápida ($m = -0.179$), y en marcado contraste con la hemolinfa no tiende al cero. Así, a partir de los días 15-21 la línea logarítmica ajustada presenta una pendiente positiva de 0.012.

2 ORGANIFICACIÓN DEL YODO

Caracterización Parcial de Moléculas Organificadas.

Para el análisis de este aspecto únicamente se incluyeron animales sacrificados en el intervalo de 11 a 15 días post-inyección. Las tablas VIII y IX resumen los resultados obtenidos con los dos sistemas analíticos utilizados. Se muestran los valores promedio de movilidad relativa (Rf) así como el coeficiente de variación (% CV) de las moléculas yodadas patrón y de los extractos experimentales obtenidos con cada uno de los sistemas. Obsérvese que en ambos sistemas la variación en los Rfs de las moléculas patrón es (6 %), a excepción de aquellas que permanecen cercanas al origen (DIT y rT₃).

% DE RADIATIVIDAD

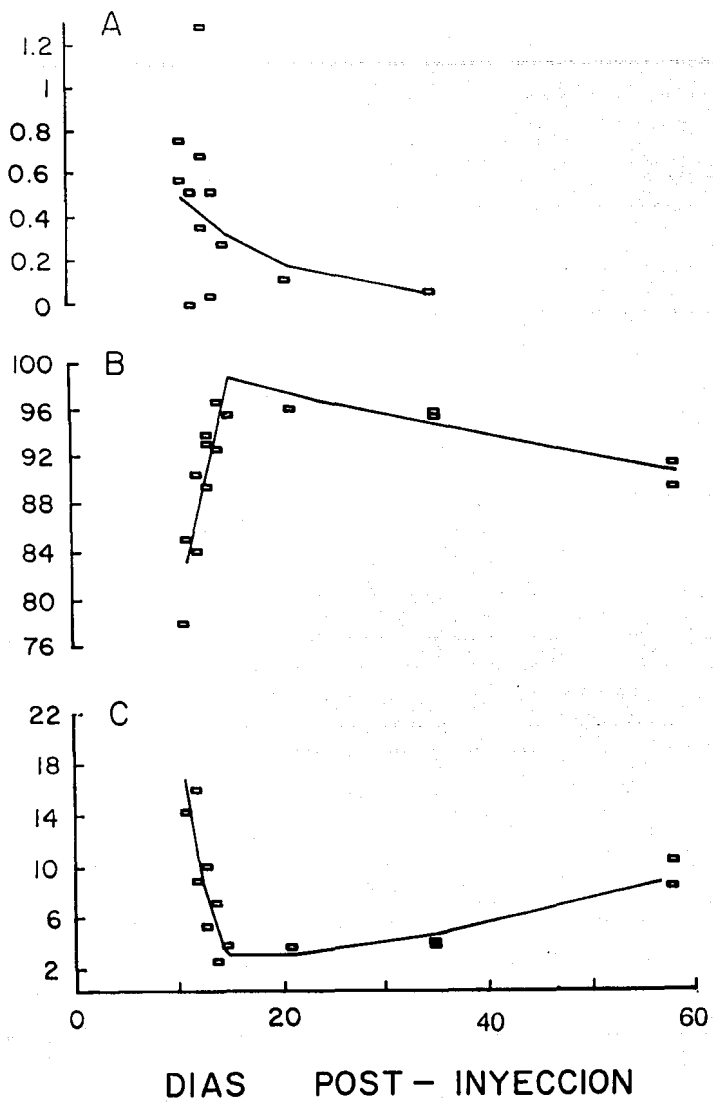


FIGURA 7. DISTRIBUCION TEMPORAL DE RADIOYODO EN EL ORGANISMO. Se cuantificó la radiactividad de cada uno de los siguientes compartimentos: A, hemolinfa; B, tejido cuticular y C, tejido parenquimatoso. La suma de todos estos compartimentos se tomó como el 100 % de cada uno de los individuos. Las curvas ajustadas (--) son el antilogaritmo de las regresiones lineales calculadas. La desaparición del isótopo en A se ajusta a una caída exponencial que sugiere la desaparición sostenida. En contraste, la cutícula (B) acumula rápidamente el trazador mientras que el TP lo hace a tiempos más largos (C). Para mayores detalles véase texto.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

**TABLA VIII PROMEDIO Y COEFICIENTE DE VARIACION (% CV)
DE LOS Rf EN LAS CROMATOGRAFÍAS EN PLACA FINA**

COMPUESTO (n)	Rf	% CV
DIT (20)	0.097	7.81
rT ₃ (10)	0.146	6.03
T ₄ (10)	0.184	4.32
T ₃ (10)	0.291	4.79
T ₂ (10)	0.295	4.25
¹²⁵ I (14)	0.477	4.68
Des Pc 1 (14)	0.422	8.29
Des Pc 2 (14)	0.044	34.22

* Sistema cloroformo: metanol: NH₄OH 26% (100:50:5, v/v); DIT, 3'-diyodotirosina; rT₃, 3',5',3-triyodotironina; T₄, tiroxina; T₃, 3',3,5-triyodotironina; T₂, 3,5-diyodotironina; Des Pc 1, Desconocido placa 1; Des Pc 2, Desconocido placa 2.

**TABLA IX PROMEDIO Y COEFICIENTE DE VARIACION (% CV)
CROMATOGRAFÍA DESCENDENTE EN PAPEL**

COMPUESTO (n)	Rf	% CV
Dit (6)	0.016	44.32
rT ₃ (7)	0.621	6.80
T ₄ (6)	0.695	4.44
T ₃ (7)	0.840	3.31
T ₂ (9)	0.890	2.73
¹²⁵ I (5)	0.306	4.74
Des Pp 1 (4)	0.871	1.64
Des Pp 2 (4)	0.317	15.17

* Sistema NH₄OH: alcohol ter-amílico: hexano (6:5:1, v/v)
Des Pp 1, Desconocido papel 1; Des Pp 2, Desconocido papel 2;
Demás abreviaturas véase tabla VII.

Cromatografía en Placa Fina. En la figura 8 se muestra un radiocromatograma típico obtenido con el extracto TP de un animal sacrificado 14 días después de administrado el trazador. Se observa la presencia de dos componentes o áreas en las que el porcentaje de radiactividad es mayor. La primera, cuyo Rf es de 0.437, contiene el 57% del total de la radiactividad la cual se distribuye en cuatro fracciones (0.5 cm c/u). Este primer componente se designó como "desconocido placa 1" (Des Pc 1). El segundo componente tiene un Rf menor (0.062) y solamente incluye el 14% de la radiactividad total, la cual se distribuye en cinco fracciones. Este segundo componente se denominó "desconocido placa 2" (Des Pc 2).

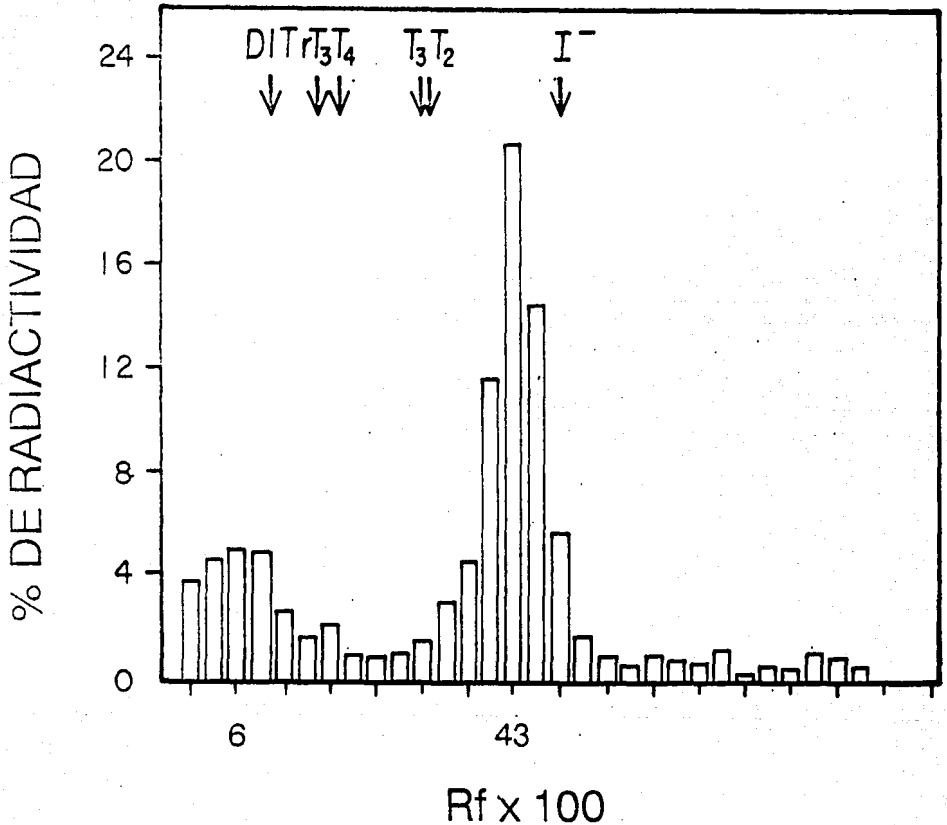


FIGURA 8. RADIOCROMATOGRAMA TÍPICO DE UN EXTRACTO TP EN PLACA FINA. Los resultados se expresan como el porcentaje obtenido de cada fracción con respecto al total de radiactividad cuantificada en todas las fracciones. De esta misma manera se presentan los resultados en las otras radiocromatografías. Obsérvese la presencia de los dos "picos". El primero (Des Pc 2) tiene un Rf de 0.062 que es muy cercano al de DIT (Rf 0.110). El otro pico (Des Pc 1) tiene un desplazamiento mayor (Rf 0.437) y difiere por 1 cm del I⁻ y no corresponde a ninguna de las tironinas patrón cromatografiadas en paralelo.

En la figura 9 se muestra un radiocromatograma típico de un extracto de hemolinfa proveniente de dos animales sacrificados 14 días después de administrado el trazador. Es notable la semejanza entre el extracto TP y el de la hemolinfa. Así, en esta última también se aprecia la presencia de los dos componentes antes descritos.

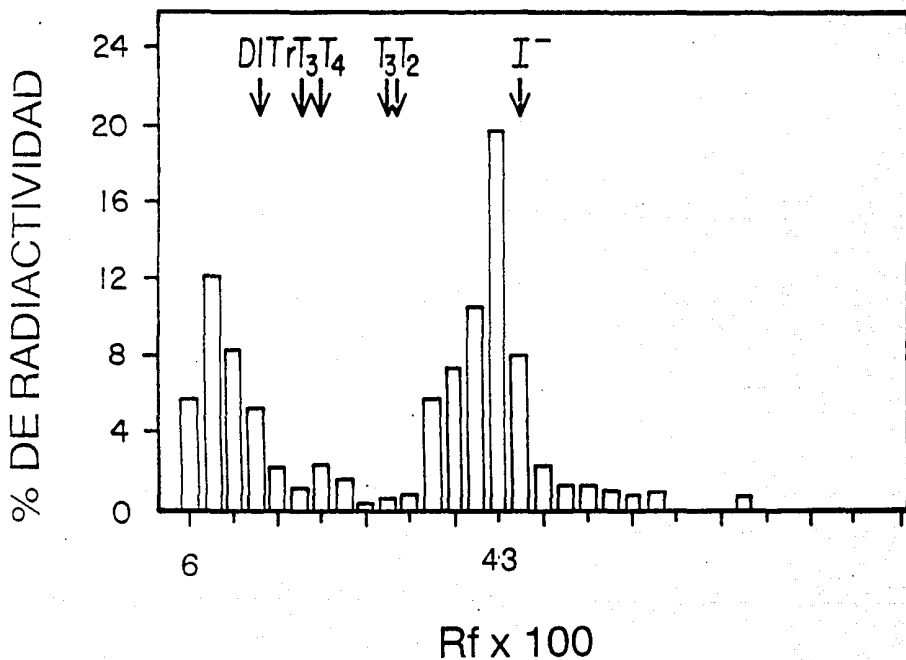


FIGURA 9. RADIOCROMATOGRAMA DE UN EXTRACTO DE HEMOLINFA EN PLACA FINA. Obsérvese la gran similitud del patrón cromatográfico con respecto al obtenido en el extracto TP (figura 8). La fracción Des Pe 2 tiene un Rf muy bajo (0.062), inclusive menor al de DIT y Des Pe 1 (0.437) tiene un Rf poco menor al de Na²⁵¹.

La tabla VIII muestra los resultados obtenidos al analizar 12 extractos TP provenientes de 10 animales, así como 2 extractos de hemolinfa obtenidos de 4 animales. En todos los casos se trata de animales sacrificados entre los días 11 a 15 postinyección del trazador. Se aprecia de manera consistente la presencia de los dos componentes antes referidos. Es notable que para ambos los Rf no corresponden a los de las moléculas patrón co-cromatografiadas en los diferentes experimentos. También es importante destacar que el Rf de Des Pc 1 fue consistentemente menor al del Na¹²⁵I (0.422 + 0.035 Vs 0.477 + 0.022).

Cromatografía en Papel En la figura 10 se muestra un radiocromatograma del extracto TP de un animal macho sacrificado 14 días después de administrado el trazador. Nuevamente es clara la presencia de dos componentes o áreas en las que el porcentaje de radiactividad es mayor. La primera, cuyo Rf es de 0.833, se distribuye en cinco fracciones (1 cm c/u). Este primer componente se designó como "desconocido papel 1" (Des Pp 1). El segundo componente tiene un Rf menor (0.224) y se distribuye en tres fracciones. Este segundo componente se denominó "desconocido papel 2" (Des Pp 2). Como se aprecia en la figura 8 los Rf de T₃ y 3,5-T₂ (0.878 y 0.833, respectivamente), son similares al de Des Pp 1 (0.833); mientras que el Rf de Des Pp 2 (0.224) se asemeja al del Na¹²⁵I (0.238). Estos resultados nos llevaron a incrementar la resolución de este sistema cromatográfico empleando NH₄OH, como se mencionó en procedimientos experimentales.

En esta forma y como se muestra en la figura 11, se logró que el Rf de Des Pp 1 (0.880) fuera mayor que el de T₃ y T₂ (0.818 y 0.809, respectivamente). También se observa que Des Pp 1 se distribuyó en tres fracciones, las cuales representan el 72.2% de la radiactividad total. Sin embargo, el Rf de Des Pp 2 (0.316) fue muy cercano al de ¹²⁵I (0.291) y su porcentaje de radiactividad total, distribuido en cuatro fracciones, fue de solo 11.8%.

Empleando esta misma modificación se analizaron los extractos de hemolinfa. En la figura 12 se muestra un radiocromatograma de tres animales sacrificados catorce días después de administrado el trazador. Una vez más es notable la semejanza en el comportamiento cromatográfico de ambos extractos (TP y hemolinfa).

La tabla IX muestra los resultados obtenidos al analizar 3 extractos TP provenientes de 3 animales; así como el del extracto combinado de hemolinfa obtenido de 3 animales. En todos los casos se trata de animales sacrificados entre los días 11 a 15 postinyección del trazador. Se aprecia de manera consistente la presencia de los dos componentes antes referidos. Es notable que el Rf de Des Pp 1 no corresponde a los de las moléculas patrón co-cromatografiadas en los diferentes experimentos. Así, el Rf de Des Pc 1 fue consistentemente mayor al de T₃ (0.830 + 0.025 vs 0.872 + 0.014). En contraste, Des Pp 2 tuvo un Rf muy cercano al de I- (0.317 + 0.048 vs 0.306 + 0.015).

% DE RADIOACTIVIDAD

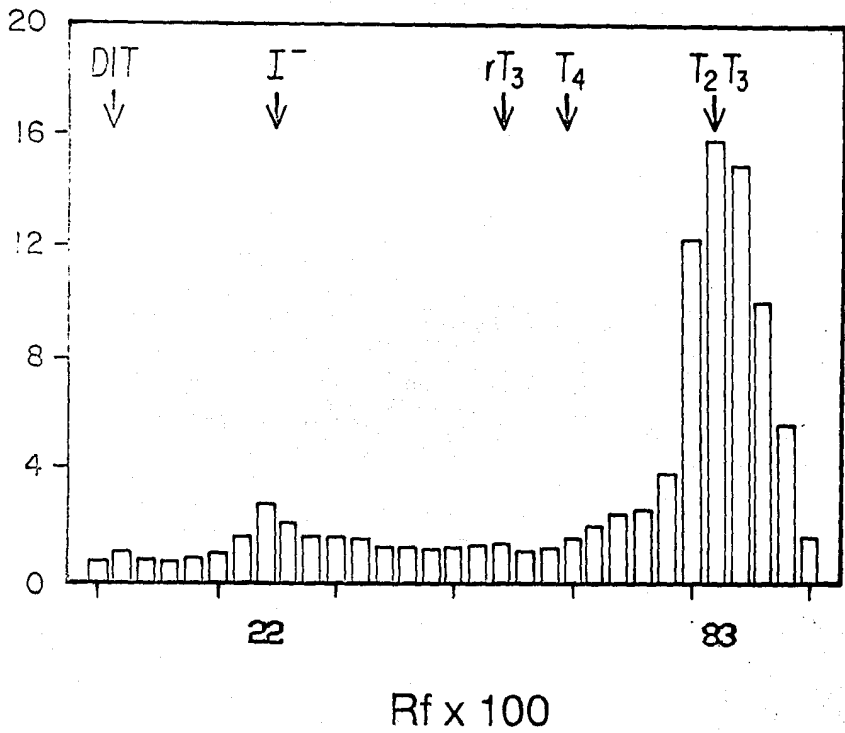


FIGURA 10. RADIOCROMATOGRAMA DE UN EXTRACTO TP EN PAPEL. Obsérvese nuevamente la presencia de dos picos principales. El primero (Des Pp 2) presenta un Rf (0.224) muy parecido al de I- (0.238). El pico con mayor radioactividad Des Pp 1 tuvo un Rf de 0.833 y una pobre resolución en este sistema cromatográfico con respecto a T₂ y T₃ (Rf de 0.833 y 0.878, respectivamente). Recuérdese que en placa fina no se observó correspondencia con estas tironinas. Los Rf de las demás moléculas fueron: DIT (0.006), rT₃ (0.560) y T₄ (0.652).

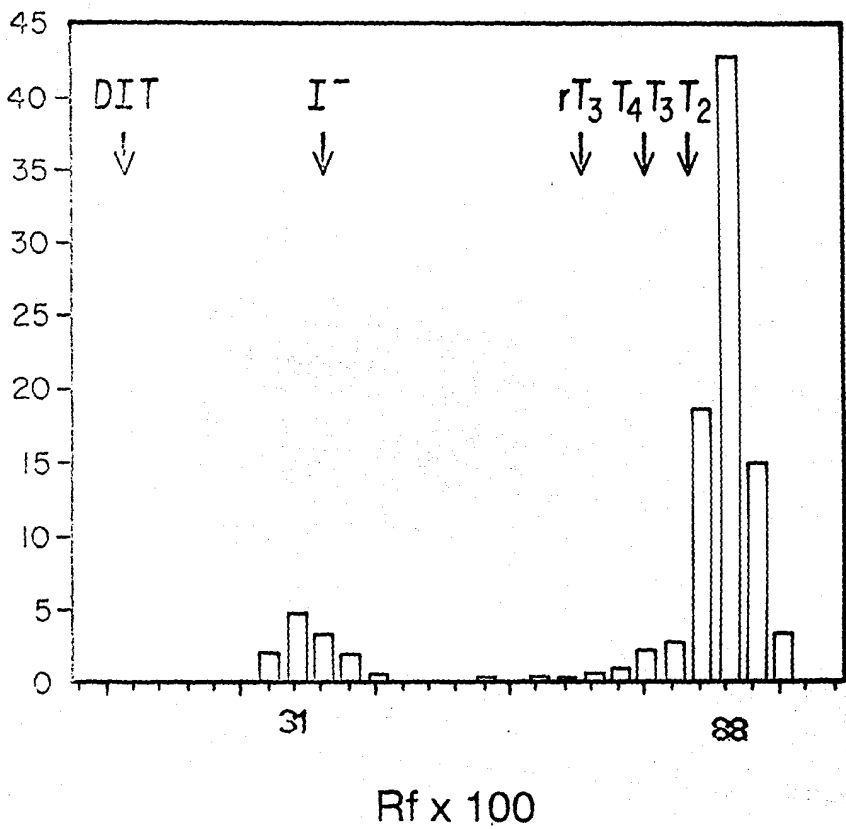


FIGURA 11. RADIOCROMATOGRAMA TÍPICO DE UN EXTRACTO TP EN PAPEL. En este sistema modificado obsérvese como se presentan los dos picos principales referidos en la figura 10. Sin embargo, T₂ y T₃ se diferencian mejor de Des Pp 1 y que su Rf es mayor al de todas las tironinas. Por otro lado, Des Pp 2 presentó un Rf poco menor al de 1.

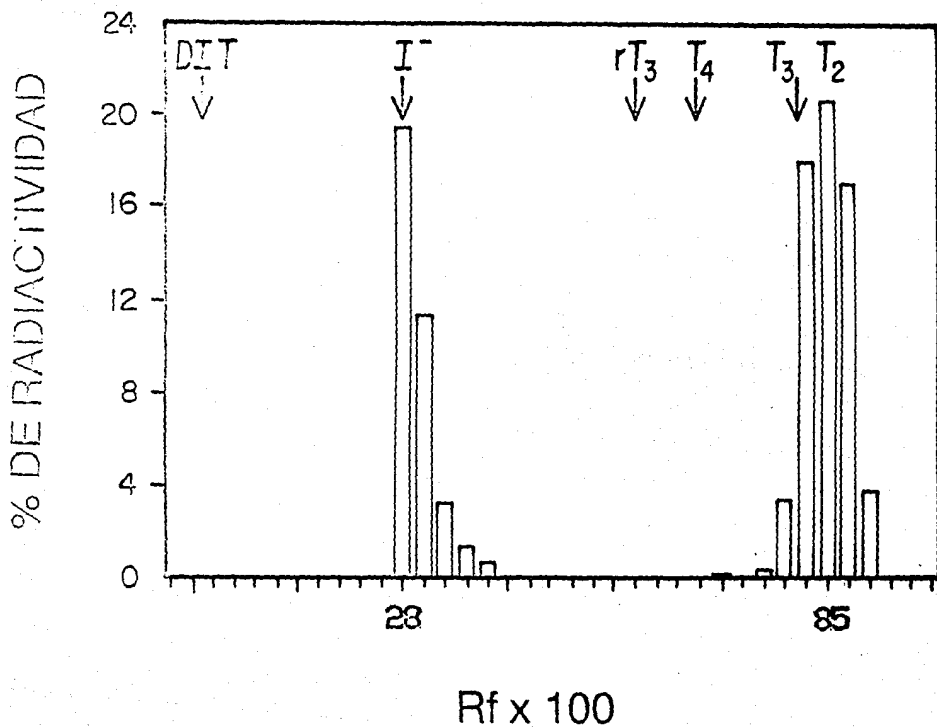


FIGURA 12. RADIOCROMATOGRAMA DE UN EXTRACTO DE HEMOLINFA CROMATOGRAFIADO EN PAPEL. Obsérvese el parecido con el patrón cromatográfico del extracto TP: Des Pp 2 con un Rf parecido al del I- y Des Pp 1 con un Rf mayor al de todas las moléculas yodadas patrón.

DISCUSION

Los resultados de la presente tesis muestran que *P. americana* concentra radioyodo no sólo en el exoesqueleto sino también en órganos parenquimatosos, y que en estos últimos el isótopo es organificado en compuestos hidrosolubles que también están presentes en la hemolinfa del organismo.

OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

La preparación de un extracto lo suficientemente puro de tironinas radioyodadas libres es un requisito indispensable para realizar análisis cromatográficos confiables, lo cual se logra al utilizar el método descrito por Gordon y col (1982). Sin embargo, el extracto acuoso resultante, pese a contener pocas proteínas y estar libre de lípidos, contiene sales que dificultan el análisis cromatográfico en placa fina y tiene que ser concentrado mediante la evaporación rotatoria y la liofilización. La no disponibilidad del equipo necesario nos llevó a extraer la fase acuosa con acetato de etilo:butanol (9:1, v/v). La polaridad y la volatilidad del sistema de solventes permitió resolver estos inconvenientes. Además, el procedimiento elimina las proteínas existentes en el extracto acuoso (Bianchi y col, 1984).

Esta extracción fue optimizada mediante el uso de un pH básico (9.6) para solubilizar moléculas yodadas en la fase acuosa durante la deslipidización y demostramos en este trabajo que al disminuir el pH a 3.5-4 aumenta la cantidad de radiactividad extraída con acetato de etilo:butanol (9:1, v/v). Estos resultados pueden explicarse por un cambio en la ionización de las moléculas extriídas, de tal suerte que a pH 9.6 sean solubles y a pH 4 disminuya su solubilidad en agua.

Por otro lado, los resultados de la presente tesis muestran claramente que la metodología de extracción empleada es selectiva para tironinas y yodoaminoácidos, y que conforme transcurre el tiempo de administración del isótopo, aumenta el porcentaje de radioyodo extraído. El incremento fue en promedio 7 veces mayor en un lapso que abarcó desde los primeros minutos de administración hasta 11 a 15 días. Este hecho sugiere que conforme transcurre el tiempo de administración, aumenta la organificación del radioyodo en el TP.

En contraste con los estudios previos en invertebrados que utilizaron hidrólisis química o enzimática para obtener un extracto inicial y que posteriormente se extraía con n-butanol (Wheler, 1950; Gorbman y col, 1954; Limpel y Casida, 1957; Spangenberg, 1971), los resultados de la presente tesis muestran que en el tejido parenquimatoso de *P. americana* existen moléculas yodadas hidrosolubles. En efecto, por la concentración de hidrogeniones y la temperatura (pH 9.6 y pH 4 a 20 °C), es improbable que el procedimiento de extracción empleado en este trabajo rompa enlaces covalentes. Sobre estas bases es válido asumir que las moléculas obtenidas en este extracto acuoso inicial se encontraban

libres. El hecho de que el material extraído del tejido parenquimatoso sea hidrosoluble y la presencia de un material con patrones cromatográficos semejantes en la hemolinfa, robustece la posibilidad de que la organificación de yodo en este tejido se asocie a la síntesis de moléculas libres que circulan en el organismo y que podrían tener la función de mensajeros químicos. Además, debe destacarse que el empleo de n-butanol extrae yodo inorgánico además de yodotironinas y yodoaminoácidos (Roche y col, 1954). En contraste y como ya se mencionó antes, la combinación acetato de etilo:butanol reduce significativamente la extracción del yodo inorgánico y aumenta la selectividad del procedimiento para extraer moléculas orgánicas yodadas.

DISTRIBUCIÓN ENDÓGENA DEL YODO

Hasta donde conocemos este es el primer estudio que plantea un análisis parcial del curso temporal que exhibe la distribución endógena de radioyodo en invertebrados. En efecto, aunque originalmente diseñados con otro propósito, los experimentos de la presente tesis permitieron hacer un análisis preliminar y consecuentemente incompleto del metabolismo del yodo en *P. americana*. El hallazgo de que la mayor proporción del yodo (82 a 96 %) se concentra en las estructuras escleroproteínicas que conforman el exoesqueleto de este organismo, confirma en parte estudios semejantes en otros invertebrados en los cuales se muestra además, que este proceso se acompaña de la organificación del yodo dando lugar primordialmente a la formación de monoyodotirosina (Wheler, 1950; Gorbman, 1954; Limpel y Casida, 1957). Sin embargo y en contraste con estudios previos en *P americana* (Limpel y Casida, 1957), los resultados del presente trabajo muestran que la acumulación / organificación del isótopo en el exoesqueleto ocurre en forma rápida y progresiva, exhibiendo un patrón exponencial y asintótico que sugiere un proceso de saturación. Por otra parte, la acumulación / organificación del yodo en las estructuras parenquimatosas ocurre de manera más lenta y su comportamiento sugiere la presencia de al menos dos procesos: la acumulación y la organificación del isótopo en una o más moléculas que permanecen en el tejido.

La posibilidad de que el yodo se organifique en el tejido parenquimatoso se fortalece por los resultados obtenidos del análisis cromatográfico de los diferentes extractos, así como por la dinámica que exhibe el isótopo en la hemolinfa y en el TP. A este respecto conviene recordar que al igual que el resto de los artrópodos, *P. americana* tiene un sistema circulatorio abierto (Barnes, 1986). Por esta razón, parte del material existente en la fracción denominada TP es hemolinfa. Así, en esta última y con la cautela que impone lo pequeño de la muestra por arriba de los días 15 post-inyección, la desaparición del isótopo muestra un comportamiento de 1^{er} orden que permite sugerir la depuración del yoduro del sistema circulatorio y que es concomitante a la desaparición inicial (primeros 11 - 15 días post-inyección) que ocurre en TP. Sin embargo y en marcado contraste con lo observado en la hemolinfa, a partir de los 21 días postinyección el yodo en TP exhibe un proceso de acumulación y organificación, el cual es congruente con los resultados obtenidos respecto al aumento del porcentaje de extracción de moléculas radiyodadas e hidrosolubles en estos lapsos.

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE MOLÉCULAS ORGANIFICADAS

Los análisis cromatográficos realizados en la presente tesis con los diferentes extractos muestran consistentemente la presencia de dos "picos" de radioyodo organificado. En contraste con los trabajos previos (Gorbman, 1954; Limpel y Casida, 1957; Spangenberg, 1971) cuyos sistemas cromatográficos (principalmente butanol: ácido acético: agua) carecen de la resolución adecuada para diferenciar yodotironinas (Roche y col, 1954), los dos sistemas empleados en el presente trabajo si poseen la requerida o al menos una mayor resolución (Simpson y Osborn, 1968; Nakamura y col, 1977). Así, y no obstante que estas diferencias metodológicas invalidan la comparación estricta, es importante destacar que los resultados obtenidos en esta tesis coinciden en parte y amplían sustancialmente las observaciones del único estudio previo que conocemos sobre *P. americana* (Limpel y Casida, 1957). Como se resume en la tabla X y empleando un solo sistema cromatográfico, estos investigadores observaron yodotirosinas en los radiocromatogramas de los hidrolizados de cutícula, mientras que las yodotironinas se encontraron exclusivamente en hidrolizados de tejido parenquimatoso. Al analizar su distribución órgano específica, encontraron la mayor concentración de tironinas en tejido adiposo (27%), notocorda (20%) y músculo (20%). En contraste con estos estudios donde se observa repetidas veces la presencia de T₄ y posiblemente T₃ en *P. americana*, los análisis cromatográficos de la presente tesis muestran la presencia de dos moléculas radioyodadas cuyo comportamiento no corresponde al de las yodotironinas y yodoaminoácidos patrón cromatografiadas en paralelo (DIT, rT₃, T₄, T₃, T₂). Este tipo de inconsistencia es común al resto de trabajos que sobre este aspecto se han realizado en invertebrados. Así, en el caso de *Aurelia aurita* persiste la controversia acerca de la identificación certera de T₄ (Spangenberg, 1971; Silverstone y col, 1978). Esta situación hace evidente que la identificación definitiva de estas moléculas requiere el empleo de métodos analíticos con mayor especificidad; vgr, la combinación de uno o más de los siguientes métodos: cromatografía líquida de alta resolución, inmunoanálisis, espectrometría de masas, etc.

TABLA X MOLECULAS YODADAS Y DISTRIBUCION
DE RADIOYODO EN P. americana (machos) # @

TEJIDO	% de Radiocactividad Total ^					COEFICIENTE DE CONCENTRACION*
	I-	MIH	MIT	DIT	T4-T3	
Cuticula	---	99	---	---	---	4.06 ± 0.49
Hemolinfa	90	0	10	0	0	1.37 ± 0.46
Túbulos de Malpighio	58	42	0	0	0	0.85 ± 0.21
Intestino						
delantero	49	1	44	1	5	0.60 ± 0.11
medio	39	---	52	4	7	0.59 ± 0.09
trасero	39	1	59	---	0	0.85 ± 0.21
Glandulas						
accesorias	23	1	76	0	---	0.16 ± 0.04
salivales	100	0	0	0	0	0.14 ± 0.07
Notocorda	62	---	18	0	20	0.10 ± 0.02
Tejido graso	55	0	16	2	27	0.08 ± 0.02
Músculo	1	1	22	56	20	0.06 ± 0.01
Traquea	-	-	-	-	-	0.43 ± 0.08
Testiculos	-	-	-	-	-	0.28 ± 0.06
Heces	0	94	0	0	6	-

Tomado de Limpel y Casida, 1957; @ Sacrificados 24 hr post-inyección; ^ Promedio de 3 radiocromatogramas;

* c p m / mg de tejido

media de c p m/mg de todos los tejidos individuales

MIH, Monoyodohistidina; ---, Trazas; -, No cuantificado.

Demás abreviaturas véase tabla VIII.

COMENTARIOS FINALES Y PERSPECTIVAS

El análisis global de los resultados obtenidos en esta tesis así como de la información disponible sobre el particular muestra claramente que:

- Además de su organización en el exoesqueleto, en *P. americana* el yodo es acumulado y organizado por el tejido parenquimatoso.
- Esta organización da lugar a la "síntesis" de moléculas yodadas hidrosolubles.
- Dichas moléculas se encuentran libres y circulan dentro del organismo.

Por otra parte y aunque la falta de suficientes "patrones" impidió identificar con certeza la naturaleza química de las moléculas radioyodadas, en un terreno marcadamente especulativo, es pertinente mencionar que el comportamiento cromatográfico del material designado como Des P_c 1 es semejante al de algunos di- y tri-yodotirocicos cuando se emplea el mismo sistema (Osborn y Simpson, 1969). Además, y en consistencia con esta especulación, en cromatografía descendente en papel, el comportamiento de Des P_p 1 nuevamente coincide con el exhibido por algunos triyodotirocicos (Nakamura y col, 1977). Con la cautela implícita, esta semejanza o coincidencia plantea la interesante posibilidad de que en invertebrados estos "metabolitos" de las tironinas fungieran como los mensajeros químicos. Al respecto cabe recordar que los triyodotirocicos poseen actividad biológica en vertebrados en algunos ensayos *in vitro* (De Groot, 1979) y la misma afinidad por el receptor nuclear de T₃ (Oppenheimer, 1973).

BIBLIOGRAFIA

- Alpatov, W. W. "The influence of thiroid gland feeding on the acceleration of the growth of larvae of *Drosophila melanogaster*". Proc. Natl. Acad. Sci. 15:578-580 (1929)
- Alpatov, W. W. "Growth and variation of the larvae of *Drosophila melanogaster*". J. Exp. Zool. 52:407-432 (1929)
- Barnes, R. D. "Zoología de los invertebrados" Ed Interiberoamericana Cap 16 Insectos Pp:879-913 (1986)
- Bianchi, R.; Molea, N.; Cazzuola, F.; Fusani, L.; Lotti, M.; Bertelli, P.; Feroleghini, M. y Mariani, G. "High-performance liquid chromatographic separations of iodoaminoacids for tracer turnover studies of thyroid hormones in vivo". J. Chromatog. 297:393-398 (1984)
- Brannon, C. H. "Observations on the blow-fly *Lucilia sericata meig*". J. Parasitol. 20:190-194 (1934)
- Csaba, G. y Németh, G. "Effect of hormones and their precursors on protozoa -The selective responsiveness of *Tetrahymena*". Comp. Biochem. Physiol. 63:387-390 (1980)
- DeGroot, L. J. "Thyroid hormone action". En "Endocrinology" DeGroot, L. J. (edit). Grune and Stratton. Vol 1, Pp: 357-362 (1979)
- Folch, J.; Lees, M.; y Le Baron, F. N. "Preparation of lipid extracts from brain tissue" J. Biol. Chem. 191:833-841 (1951)
- Goldsmith, E. D. "Phylogeny of the thyroid: Descriptive and experimental". Ann. N. Y. Acad. Sci. 11:283-316 (1949)
- Gorbman, A., Clements, M. y O'Brien, R. "Utilization of radioiodine by invertebrates, with special study of several annelida and mollusca". J. Exp. Zool. 127:75-89 (1954)
- Gorbman, A. "Evolution of thyroid function". En "Hormonal Proteins and Peptides." Vol VI. Cho Hao Li (edit). Academic Press. Pp: 383-389 (1978)
- Gordon, J. T.; Crutchfield, F. C.; Jennings, A. S. y Dratman, M. B. "Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites" Arch. Biochem. Biophys. 216:407-415 (1982)
- Hackman, R. H. "Chemistry of the insect cuticle" En "The Physiology of Insecta" Rockstein, M. 2ª ed. N. Y. Acad. VII:215-269 (1973)
- Hadley, N. F. "The arthropod cuticle" Sci. Am. 255:104-112 (1986)
- Harris, M. J.; Higuchi, T y Rytting, J. H. "Correlation of surface area with group contributions" J. Phys. Chem. 77:2694-2703 (1973)
- Hearn, M. T. W.; Hancock, W. S. y Bishop, C. A. "High pressure liquid chromatography of aminoacids, peptides and proteins. V Separation of thyroidal iodoaminoacids by hydrophilic Ion-paired reversed-phase HPLC" J. Chrom. 167:337-344 (1978)

Jorgensen, E. C. "Thyroid hormones and analogs. I Synthesis, physical properties and theoretical calculations" En "Hormonal Proteins and Peptides." vol. VI. Cho Hao Li (edit). Academic Press. Pp:57-105 (1978)

Kunkel, B. W. "The effect of the ductless glands on the development of the flesh flies" J. Exp. Zool. 26:255-264 (1918)

Limpel, L. E. y Casida, J. E. "Iodine metabolism in insects. I. In vivo metabolism of radioiodide" J. Exp. Zool. 135:19-25 (1957)

Nakamura, Y.; Chopra, I. J. y Solomon, D. H. "Preparation of high specific activity radioactive iodothyronines and their analogs" J. Nucl. Med. 18:1112-1115 (1977)

Nowikoff, M. "Ueber die wirkung des schilddrusenextractes und andere organostoffe auf ciliaten". Arch. Protistenk. 11:309- (1908) (Citado por Schneider, 1940 a y Alpatov, 1929 b)

Oppenheimer, J. H.; Schwartz, H. L.; Dillman, W. y Surks, M. I. "Effect of thyroid hormones analogues on the displacement of ¹²⁵I-L- triiodothyronine from hepatic and heart nuclei in vivo: possible relationship to hormonal activity" Biochem. Biophys. Res. Commun. 52:544-550 (1973)

Osborn, R. H. y Simson, T. H. "The characterization of iodoaminoacids and their derivatives by thin layer chromatography" J. Chromatog. 40:219-224 (1969)

Roche, J.; Lisitzky, S. y Michel, R. "Chromatographic analysis of radioactive iodine compounds from the thyroid gland and body fluids". En "Methods of Biochemical Analysis" Vol I. Glick, D (edit). Pp: 243- 264 (1951)

Schneider, B. A. "Effects of feeding thyroid substance" Biol. Bull. 73:227- (1939) (Citado por Goldsmith, 1949 y por Schneider, 1940 b)

Schneider, B. A. "Thyroid feeding and metamorphosis. I The influence of various concentrations of thyroid substance on metamorphosis and growth of the flour beetle *Tribolium confusum duval*". J. Exp. Zool. 81:113-197 (1940 a)

Schneider, B. A. "Thyroid feeding and metamorphosis. II The influence of thyroid feeding in the first generation of *Tribolium confusum duval*, on the second, third, fourth and fifth generation without thyroid feeding". J. Exp. Zool. 81:113-197 (1940 b)

Schneider, B. A. "Thyroid feeding and metamorphosis. III The effect of excessive dosages of thyroid substance on the metamorphosis and growth of the flour beetle *Tribolium confusum duval*". J. Exp. Zool. 81:113-197 (1940 c)

Schneider, B. A. "Thyroid feeding and metamorphosis. IV Observations on two successive thyroid-fed generatiions of the flour beetle, *Tribolium confusum duval*". J. Exp. Zool. 81:113-197 (1940 d)

Schneider, B. A. "Thyroid feeding and metamorphosis. V Observations on the F1 descendants, reared wholly in pure flour, of several matings on thyroid-fed and control-fed parents of the flour beetle, *Tribolium confusum duval*". J. Exp. Zool. 81:113-197 (1940 e)

Silverstone, M.; Galton, V. A. e Ingbar, S. H. "Observations concerning the metabolism of iodine by polyps of *Aurelia aurita*" Gen. Comp. Endoc. 34:132-140 (1978)

Spangenberg, D. B. "Iodine induction of metamorphosis in *Aurelia*" J. Exp. Zool. 165:441-450 (1967)

Spangenberg, D. B. "Thyroxine induced metamorphosis in *Aurelia*" J. Exp. Zool. 178:183-194 (1971)

- Spangenberg, D. B. "Thyroxine in early strobilation in *Aurelia aurita*" *Am. Zool.* **14**:825-831 (1974)
- Spangenberg, D.B. "*Aurelia* metamorphosis. A model system for study of thyroxine action". En "Thyroid hormones and brain development" editado por Grave, G. D. Raven Press p. 151-167 (1977)
- Terao, A. y Wakamori, N. "Preliminary note on the effects of thyroid feeding on the silkworm *Bombyx mori* L." *Proc. Imp. Acad Tokyo* **7**:205. (Citado por Schneider, 1940 b)
- Taugog, A. "Hormone synthesis". En "Endocrinology". DeGroot, L. J (edit). Ed. Grune and Stratton. **1**:331-344 (1979)
- Taugog, A. "Biosynthesis of iodoamino acids" En: "Handbook of Physiology" Vol 3, Sección 7, (Endocrinology) *Am Physiol Soc* Pp:101- 133 (1974)
- Tong, W. y Chaikoff, I. L. "Stimulating effects of cytochrome c and quinones on ¹³¹I utilization by cell-free sheep thyroid gland preparations" *Biochem. Biophys. Acta.* **48**:259-270 (1961)
- Torrey, H. B. "Thyroxin as a depressant of cell division; its effect on the cleavage and early development of sea urchin and ascidian" *Endocrinology* **12**:65-80 (1928)
- Valverde-R, C.; Orozco, R. A.; Aceves, C. y Romero, C. "Control y regulación de función tiroidea" En: "Texto de Fisiología" SMC-SEP (1990) (En prensa)
- Wheeler, B. M. "The iodine metabolism of *Drosophila gibberosa* studied by means of radioiodine ¹³¹I". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **33**:298-302 (1947)
- Wheeler, B. M. "Halogen metabolism of *Drosophila gibberosa*". *J. Exp. Zool.* **115**:83-107 (1950)
- Woodruff, L. L. "The effect of thyroid products on *Paramecium*" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **20**:386. (1923) (Citado por Schneider, 1940 a)

APÉNDICE A: Clasificación taxonómica de *P americana*

Reino: *Animalia*
Phylum: *Arthropoda*
Clase: *Insecta*
Orden: *Orthoptera*
Familia: *Blattidae*
Género: *Periplaneta*
Especie: *americana*